

THESIS

MARBURG

1965

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

damaliger Direktor: Professor Dr. rer. nat., Dr. med. h. c. Th. Bücher

Über das Vorkommen einer mitochondrialen Form der Creatinkinase

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

in der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität zu Marburg/Lahn

vorgelegt von

Hans Jacobs

aus Rostock

Marburg 1965

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut
der Philipps-Universität Marburg/Lahn
damaliger Direktor: Professor Dr. rer. nat., Dr. med. h. c. Th. Bücher

Über das Vorkommen einer mitochondrialen Form der Creatinkinase

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

in der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität zu Marburg/Lahn

vorgelegt von

Hans Jacobs

aus Rostock

Marburg 1965

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 2.12.1965

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. med. O. Braun-Falco

Referent: Doz. Dr. rer.nat. M. Klingenberg

Correferent: Prof. Dr. rer.nat. Dr. med. h.c. Th. Bücher

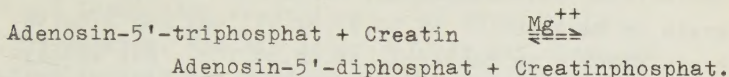
Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einführung	1
Problemstellung	4
Ergebnisse	4
I. Nachweis von Creatinkinase (CK) in isolierten Mitochondrien.	4
1. Vorkommen und Aktivität von CK in Mitochondrien	4
2. Konstante Relation zum Cytochromgehalt	6
3. Anteil der mitochondrialen CK an der Gesamtaktivität	7
4. Vergleich mit der fraktionierten Enzymextraktion aus Gewebe	8
II. Bindung und Lokalisation der CK in Mitochondrien	10
1. Ablösbarkeit der mitochondrialen CK	10
a. Einfluß der Osmolarität?	12
b. Spezifischer Phosphateffekt?	14
2. Bindung von Lactatdehydrogenase in Mitochondrien	14
3. Proteinasewirkung auf CK in Mitochondrien	18
4. Vergleich elektronenmikroskopischer Aufnahmen von Mitochondrien	19
III. Charakterisierung der CK von Mitochondrien als mitochondriales Isoenzym.	20
1. Isoenzymtrennung durch Elektrophorese	21
a. Agar-Gel-Elektrophorese	21
b. Agarose-Gel-Elektrophorese	24
2. Isoenzymtrennung durch Ionenaustauschchromatographie	25
IV. Untersuchungen zur Funktion der CK in intakten Mitochondrien	29
1. Bildung von Creatinphosphat (Cr-P) durch Mitochondrien	29
a. Einbau von P^{32} in Cr-P	29
b. Steigerung der Cr-P-bildung durch Creatin und ADP	31
c. Einfluß von Mg^{++}	31
2. Übertragung von Phosphatenergie aus Cr-P auf die Atmungskette	33

V. Versuche zur Reinigung des Enzyms	35
1. Vorreinigung	35
2. Instabilität gegen Aethanol	35
3. Aceton- und Ammonsulfatfraktionierung	36
4. Chromatographie an TEAE-Cellulose u. Sephadex	37
5. Reaktivierung durch Glutathion	37
6. Gleichbleiben der elektrophoretischen Mobilität	39
7. Spektrum	40
Experimentelle Methodik	42
1. Isolierung von Mitochondrien	42
2. Extraktion der mitochondrialen Enzyme	43
3. Fraktionierte Extraktion von Gesamtgewebe	43
4. Bestimmung der Enzymaktivität	44
5. Elektrophoretische Isoenzymtrennung	45
6. Chromatographische Isoenzymtrennung	46
7. Analyse der Creatinphosphatbildung	47
a. Nachweis von Cr-P durch Ionenaustauschchromatographie	48
b. Nachweis von Cr-P durch enzymatische Analyse	48
8. Direktregistrierung der Phosphatenergieübertragung mit dem Doppelstrahlspektrophotometer	49
Diskussion	50
1. Vorkommen von Creatinkinase in Mitochondrien	50
2. Konstante Relation der m-CK-Aktivität zum Cytochromgehalt	51
3. Ablösbare mitochondriale Enzyme	52
4. Verhalten der m-CK als Isoenzym	53
5. Zur biochemischen Funktion des Enzyms	55
6. Physiologische und zellphysiologische Bedeutung des Enzyms	56
7. Folgerungen für die klinische Enzymdiagnostik	59
Zusammenfassung	61
Verzeichnis der Abkürzungen	63
Literatur	64

Einführung

Das Enzym Creatinkinase katalysiert die Reaktion:



Nach der Nomenklatur der "International Commission on Enzymes" [23] ist das Enzym als "Adenosintriphosphat-Creatin-Phosphotransferase" (Kennzahl 2.7.3.2) zu bezeichnen. In dieser Arbeit wird zur Vereinfachung die bekannte ältere Bezeichnung Creatinkinase beibehalten.

Das Enzym wurde 1932 von MEYERHOF und LOHMANN [80] entdeckt. Die ersten Untersuchungen über das Enzym wurden von LOHMANN [75] und LEHMANN [73] durchgeführt. Sie stellten fest, daß es sich um eine reversible Übertragungsreaktion einer energiereichen Phosphatgruppe zwischen den oben in der Gleichung angeführten Partnern handelt. Diese sog. "Lohmann-Reaktion" ist bis heute die einzige nachgewiesene Transphosphorylierungsreaktion des Creatins. Die von O. CORI [24] beschriebene Reaktion zwischen Creatin und 1,3-Diphosphoglycerat wurde von MORRISON [27,31] als experimenteller Fehler erkannt.

Das Enzym ist weit verbreitet im Tierreich und findet sich vorwiegend in Muskeln, elektrischen Organen und Nervengewebe [c.f.36]. Die physiologische Bedeutung wurde bald nach der Entdeckung erkannt: MEYERHOF und seine Mitarbeiter [80] und LUNDSGAARD [76,77,78] zeigten, daß das Enzym entscheidend am Muskelstoffwechsel bei der Kontraktion beteiligt ist. Das Enzym ermöglicht die rasche Resynthese des bei der Kontraktion gespaltenen ATP durch Phosphatübertragung aus den im ruhenden Muskel gespeicherten Vorräten an Creatinphosphat.

Creatinkinase wurde erstmals 1953 von KUBY et al. [66] in Madison aus Kaninchenmuskel in kristalliner Form rein dargestellt. Dadurch wurde die genaue Bestimmung des Molekulargewichts und der kata-

lytischen Eigenschaften ermöglicht. Seither sind in zahlreichen Untersuchungen, besonders von dem Arbeitskreis in Madison [67,68,92,93,94,95] und dem Arbeitskreis ENNOR's in Canberra [35,88,89,103], die katalytischen Eigenschaften und die Kinetik der Creatinkinase-Reaktion studiert worden. Die theoretischen Grundlagen der Kinetik haben KUBY und NOLTMANN 1962 [69] in einer umfassenden mathematischen Analyse dargestellt. Die von ihnen theoretisch abgeleiteten Daten zur Kinetik der Creatinkinase-Reaktion wurden inzwischen durch kernresonanzspektroskopische Untersuchungen von M.COHN [22] experimentell bestätigt.

Eine andere Forschungsrichtung beschäftigte sich nach der Reindarstellung des Enzyms mit seiner chemischen Analyse. Von FRIEDBERG [40] und von NOLTMANN [95] wurde die Aminosäurezusammensetzung bestimmt. Die Analyse der Aminosäuresequenz des aktiven Zentrums durch THOMSON et al. [114] ist ein erster Schritt zur Sequenzanalyse des ganzen Creatinkinase-Moleküls.

Die Isolierung der Creatinkinase durch KUBY war Vorbild bei der Isolierung weiterer Enzyme dieses Typs: Argininkinase [86] und andere ATP-Guanidino-Phosphotransferasen wurden inzwischen rein dargestellt. Die Gruppe VAN THOAI's [111,112,113,101,102] am College de France hat in den vergangenen Jahren die vergleichende Biochemie dieser Enzyme intensiv vorangetrieben. Ihre Befunde über das gleichzeitige Vorkommen von Creatinkinase und anderen ATP-Guanidino-Phosphotransferasen in einem Organismus stellen die phylogenetische, ontogenetische und physiologische Forschung vor neue, ungelöste Probleme.

Das physiologische Studium der Creatinkinase-Reaktion erhielt neue Impulse durch Publikationen von FLECKENSTEIN et al. [38] und MOMMAERTS [81]. Diese Autoren fanden, daß Muskeln Einzelkontraktionen durchführen können, ohne daß eine Spaltung von ATP oder Creatin-

phosphat nachweisbar ist. Dadurch erschienen vorübergehend die klassischen Auffassungen von MEYERHOF und LUNDSGAARD erschüttert. DAVIES et al. [14, 15, 53] zeigten, daß die neuen Befunde auf einer Unempfindlichkeit der verfügbaren Meßmethodik beruhten. Durch Verwendung von Hemmstoffen konnten DAVIES et al. diese Schwierigkeit überwinden. Sie konnten zeigen, daß auch bei der Einzelzuckung des Muskels in der Primärreaktion ATP gespalten wird und in sekundärer Reaktion durch Creatinkinase wieder aufphosphoryliert wird. Die klassische Theorie der Energieübertragung ist damit weiter gültig.

Zellphysiologische Gesichtspunkte wurden bis in die neueste Zeit beim Studium der Creatinkinase nicht berücksichtigt. Daten über die intrazelluläre Verteilung der Creatinkinase waren bis jetzt nicht verfügbar. YAGI und Mitarb. [127] haben die Möglichkeit des Vorkommens einer myofibrillengebundenen Creatinkinase und ihre Bedeutung für die Muskelkontraktion betont. Allgemein wurde aber bis jetzt angenommen, daß Creatinkinase ein ausschließlich im hyaloplasmatischen Zellraum (Cytoplasma) löslich vorhandenes Enzym sei [so z.B. 13]. In neuester Zeit hat noch einmal KLEINE [60] versucht, am menschlichen Skelettmuskel nachzuweisen, daß Creatinkinase nur im Cytoplasma, nicht aber in Kernen, Mitochondrien und Mikrosomen lokalisiert sei.

Beobachtungen von DELBRÜCK [29], HELDT [44, 46] und PETTE [100] aus diesem Institut deuteten aber darauf hin, daß in Mitochondrien aus Muskelgewebe Creatinkinase enthalten sein müsse.

Problemstellung

Die vorliegende Untersuchung geht aus von der Beobachtung von HELDT [44], daß isolierte Mitochondrien aus Taubenbrustmuskel und Rattenherz Creatinphosphat (Cr-P) bilden. Es stellte sich daher die Frage, wie groß die Aktivität der für die mitochondriale Creatinphosphatsynthese verantwortlichen Creatinkinase (CK) ist, und ob sich das mitochondriale Enzym von der bisher bekannten Form der Creatinkinase unterscheidet.

Ergebnisse

I. Nachweis von Creatinkinase in isolierten Mitochondrien.

Es wurden Mitochondrien verschiedener Tiere und Organe isoliert und 3-mal im Überschuß von 0,3M Saccharosemedium zur Entfernung cytoplasmatischer Proteine nachgewaschen. Die löslichen Enzyme wurden durch Desintegration der Mitochondrien in Phosphatpuffer extrahiert. Am Extrakt wurde die Aktivität der Creatinkinase (CK) nach BÜCHER et al. [11] bestimmt. Als Kontrollwerte wurden stets ein mitochondriales Enzym - Malatdehydrogenase (m-MDH) - und ein typisch cytoplasmatisches Enzym - Lactatdehydrogenase (LDH) - mitgemessen. Bei zu hohen LDH-Gehalten (s.u.) wurden die Mitochondrienpräparationen verworfen.

1. Vorkommen und Aktivität von Creatinkinase in Mitochondrien.

Creatinkinase wurde in beträchtlicher Aktivität in Mitochondrien aus Skelettmuskel, Herzmuskel und Hirn der Ratte, aus dem Hirn des Kaninchens, aus dem Zwerchfell vom Kalb und aus Skelettmuskel und Herzmuskel der Taube gefunden; dagegen konnte in Mitochondrien aus Leber und Niere der Ratte das Enzym nicht nachgewiesen werden.

Eine Übersicht der gemessenen Aktivitäten bei Mitochondrien der Taube und Ratte gibt Tab. 1.

Mitochondrien	CK [$\frac{\mu\text{Mol DPNH}}{\text{min.g m-Prot}^*}$]		n
	$\bar{x}$	$\sqrt{s^2}$	
Taube, Skel.muskel	1730**	352	10
Herz	700	164	7
Ratte, Skel.muskel	1010	160	11
Herz	960	180	11
Hirn	895	242	6
Leber	10		4
Niere	10		5

Tab.1: Aktivität der Creatinkinase (CK) in isolierten Mitochondrien (*pro Gramm mitochondriales Protein), ** Winterwerte
n = Zahl der Mitochondrienpräparationen
 $\bar{x}$ = Arithmetisches Mittel, $\sqrt{s^2}$ = Standardabweichung.

Während die über mehrere Jahre beobachtete CK-Aktivität der Mitochondrien der Ratten immer gleiche Höhe zeigte, fanden sich bei den Mitochondrien aus dem Brustmuskel der Taube auffällige Sommer/Winterschwankungen der Aktivität. Im Winter erreichte die CK-Aktivität der Brustmuskelmitochondrien fast den doppelten Wert des Sommers. Da die Ratten in einem thermokonstanten Raum gehalten wurden, während die Tauben aus einem Freiluftkäfig kamen, werden klimatische Einflüsse als Ursache angenommen. Gleichsinnige jahreszeitliche Schwankungen der Serum-Creatinkinase von Mäusen berichtete kürzlich NICHOL [91].

2. Konstante Relation zum Cytochromgehalt.

Die in Tab. 1 wiedergegebenen Werte der Creatinkinase der verschiedenen Mitochondrien haben unterschiedliche Höhe. Setzt man die CK-Aktivität aber zum unterschiedlichen Cytochrom a - Gehalt der Mitochondrien in Beziehung, indem man ihren "Cytochrom a-turnover" errechnet, so ergibt sich erstaunliche Einheitlichkeit. Abb. 1 zeigt die logarithmische Auftragung der Creatinkinase und der Malatdehydrogenase als Cyt. a-turnover.

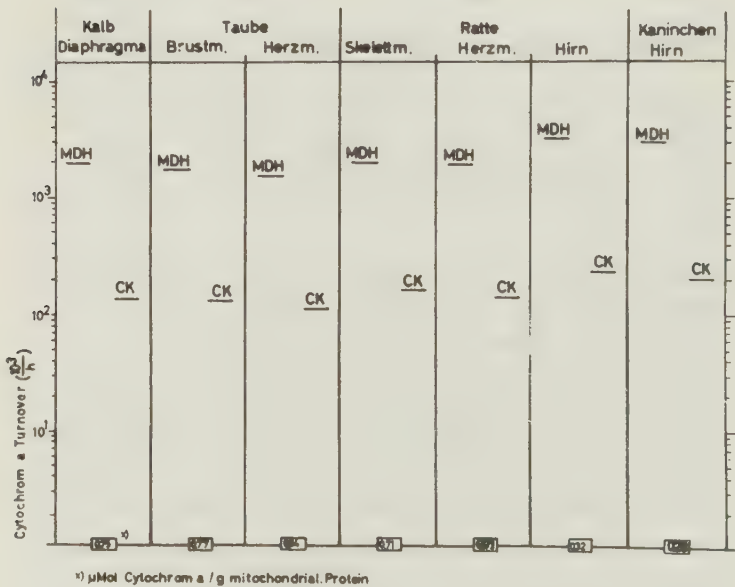


Abb. 1: Creatinkinase und Malatdehydrogenase von Mitochondrien in der Darstellung als Cyt.-a-turnover.

Die Abb. 1 macht deutlich, daß die CK der Mitochondrien in den untersuchten Fällen immer in konstanter Relation zu der MDH und zum Cyt. a vorkommt. Die Parallelität der Aktivitäten von MDH und Cyt. a, die "Proportionskonstanz", ist bereits von PETTE et al. [98] beschrieben worden. Die proportionskonstante Gruppe der Enzyme von Zitratzyklus und Atmungskette ist eines der wichtigsten Beispiele in der von BÜCHER [9.10] entwickelten Theorie der Proportionskonstanz von Enzymgruppen. Die Erscheinung der "konstanten Relation" der mitochondrialen CK zu m-MDH und Cyt. a macht unwahrscheinlich, daß es sich um eine zufällige Kontamination der Mitochondrien mit cytoplasmatischer Creatinkinase handelt.

MDH gehört zu den Enzymen höchster Aktivität in Mitochondrien. Da die CK nur um eine Größenordnung geringere Aktivität zeigt, ist sie in Muskel- und Hirnmitochondrien als Enzym hoher Aktivität anzusprechen.

3. Anteil der mitochondrialen Creatinkinase an der Gesamtaktivität.

Zur Bestimmung des Anteils der mitochondrialen Aktivität an der Gesamtaktivität wurden Gesamtbestimmungen der CK an Gewebe gemacht. Die Gesamtaktivität wurde an 1:10 Homogenaten von Gewebe in 0,1M PO_4 -Puffer mit dem "Ultra-Turrax" extrahiert. Die gemessene Aktivität ist auf das Frischgewicht der Gewebe bezogen.

Die mitochondriale Aktivität bezogen auf mitochondriales Protein läßt sich mit Hilfe des von SCHOLLMEYER u. KLINGENBERG [105] angegebenen "Cyt.a-Faktors" umrechnen in mitochondriale Aktivität bezogen auf Gewebefrischgewicht. (Der Cyt.a-Faktor gibt den Anteil mitochondrialen Proteins am Frischgewicht an).

Aus dem Vergleich der Gesamtaktivität mit der umgerechneten mitochondrialen Aktivität ergibt sich der prozentuale Anteil der mitochondrialen Aktivität an der Gesamtaktivität.

Tab. 2 gibt einen Überblick für einige Gewebe:

Gesamt- aktivität d. Gewebe		Mitochondr. Aktivität	Mitochondr. Anteil
[$\frac{\mu\text{Mol DPNH}}{\text{min.g fr}}$]		[$\frac{\mu\text{Mol DPNH}}{\text{min.g fr}}$]	
Taube, Skel. Musk.			
M. pectoralis	406	100	25%
Ratte, Skel. Musk.			
M. quadriceps	396	26	7%
Ratte, Hirn	51	16	32%
Ratte, Herz	111	53	48%

Tab.2: Anteil der mitochondrialen Creatinkinase an der Gesamt-Creatinkinase von Geweben.

4. Vergleich mit der fraktionierten Enzymextraktion von Geweben.

Obwohl die gefundene konstante Relation zwischen mitochondrialer CK und dem ausschließlich mitochondrialen Cyt.a zum Schluß führt, daß mitochondrienreiche Gewebe einen hohen Gehalt an mitochondrialer CK haben müssen und daß entsprechend der mitochondriale Anteil an der Gesamtaktivität bestimmt ist, war der Befund von 32% mitochondrialer CK in Rattenhirn und von 48% in Rattenherz überraschend.

Deshalb wurde für diese Organe mit der Methode der fraktionierten Enzymextraktion [27,7] nachgeprüft, ob die als "mitochondrial" extrahierbare Aktivität mit

den aus der Aktivität isolierter Mitochondrien berechneten Werten übereinstimmt.

Tab.3a zeigt die Werte der Kontrollbestimmungen:

	I	II	III	IV
Hirn	63%	7%	5%	25%
Herz	44%	8%	19%	29%

Tab. 3a: Fraktionierte Extraktion der Ck aus Hirn und Herz der Ratte. % der Gesamtaktivität, die bei den einzelnen Extraktionsstufen extrahiert werden. I=Extrakt. mit isoton. Saccharose, II=Reextrakt.isot.Saccharose, III=Extrakt.mit 0,1M PO_4 -pH 7,2, IV=Reextrakt. mit 0,1 PO_4 und mech. Zerstörung durch "Ultra-Turrax".

Die CK-Aktivität der "mitochondrialen" Fraktion IV gibt in der fraktionierten Extraktion von Hirn und Herz niedrigere Werte als bei der Gehaltsberechnung aus der Aktivität isolierter Mitochondrien mit Hilfe des Cytochrom-Faktors. Nur wenn man die Anteile der Fraktionen III und IV zusammenfaßt, ergibt sich gute Übereinstimmung (Tab. 3b):

	Isol.Mitoch.	Frakt.III+IV
Hirn	32%	30%
Herz	48%	48%

Tab. 3b: Vergleich des mitochondrialen Anteils an der Gesamtaktivität bei Bestimmung durch isolierte Mitochondrien und durch fraktionierte Extraktion.

Hierauf hat bereits PETTE [99] in der Diskussion über den Anteil mitochondrialer Aktivität an der Gesamt-Creatinkinase Aktivität von Rattenherz hingewiesen. Weiter unten mitgeteilte Befunde über die

Bindung der mitochondrialen CK geben eine gute Begründung, weshalb das Enzym nicht ausschließlich in der "mitochondrialen" Fraktion IV, sondern in den Fraktionen III und IV der fraktionierten Extraktion gefunden werden.

II. Bindung und Lokalisation der Creatinkinase in Mitochondrien.

Bei der weiteren Prüfung der Frage, ob die in isolierten Mitochondrien in hoher Aktivität gefundene CK ein echtes mitochondriales Enzym sei, wurden Untersuchungen über die Bindung des Enzyms an die Mitochondrien durchgeführt.

1. Ablösbarkeit der mitochondrialen Creatinkinase.

Bereits im Beginn dieser Untersuchungen hatten wir beobachtet, daß Rattenherzmitochondrien den grössten Teil ihrer CK in das Inkubationsmedium abgeben, wenn man sie für 30 min. bei 0°C in 0,1M PO_4 -Puffer von pH 7,2 inkubiert. Die mitochondriale MDH wird unter gleichen Bedingungen nur in ganz geringem Maß in Lösung gebracht.

"Steigende osmotische Aggressivität" gilt bei der Methode der fraktionierten Enzymextraktion aus Geweben [27] als eines der wirksamen Prinzipien, das auch Rückschlüsse auf Bindung und Lokalisation der Enzyme zuläßt. Wir wandten diese Methode analog auf isolierte Mitochondrien an. Vergleichende Untersuchungen mit isolierten Mitochondrien verschiedener Organe bei Inkubation mit Phosphatlösungen verschiedener Konzentration zeigten, daß charakteristische Unterschiede in der Bindung von CK und MDH an die Mitochondrien bestehen.

Abb.2 zeigt die Ablösbarkeit der CK und der MDH verschiedener Mitochondrien im Vergleich zur Gesamtaktivität, die nach mechan. Desintegration gemessen wird.

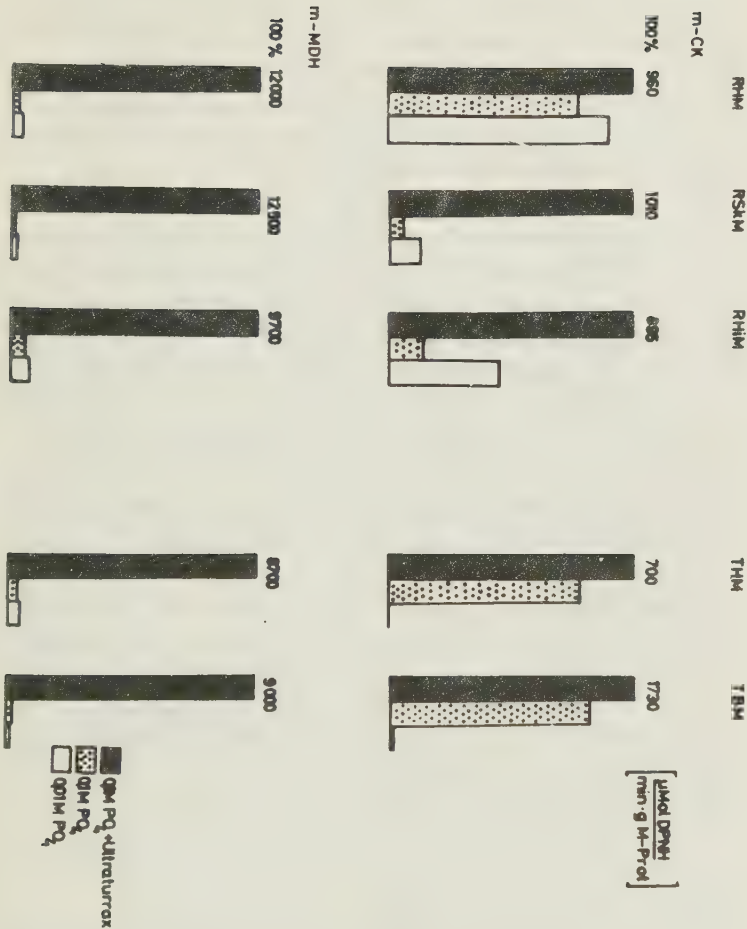


Abb.2: Ablösbarkeit der Creatinkinase und der Malatdehydrogenase von verschiedenen Mitochondrien durch mechan. Desintegration und hypotonische Phosphatlösungen. Abkürzg.: RHM=Rattenherzmitochondrien, RSkM=Rattenskelettmuskelmitoch., RHIM=Rattenhirnmitoch., THM=Taubenherzmitochondr., TBM=Taubenbrustmusk. mitoch.- Gesamtaktivität = 100% gesetzt.

Die Abbildung macht deutlich, daß die Malatdehydrogenase nur unwesentlich durch Inkubation in Phosphatpuffern freigesetzt wird (alle Werte <8%). CK geht dagegen in beträchtlicher Aktivität in Lösung. Der höchste Wert wird bei Rattenherzmitochondrien beobachtet, die in 10mM PO_4 -Puffer pH 7,2 95% ihrer gesamten Creatinkinase abgeben.

Abb. 2 läßt auch Rückschlüsse zu auf die Löslichkeit der mitochondrialen CK in der fraktionierten Extraktion von Gesamtgewebe. Die CK aus Rattenherzmitochondrien, die sich durch besonders gute Löslichkeit in Phosphatpuffer auszeichnet, sollte bei fraktionierter Extraktion im Phosphatschritt III stärker aus dem Gewebe eluierbar sein als die CK der Rattenhirnmitochondrien, die eine schlechtere Ablösbarkeit zeigt. Diese Deutung ist auf die Befunde der Tab.3a anwendbar: Aus Rattenherz treten bei Phosphateextraktion 19% der Gesamtaktivität aus, während aus Rattenhirn beim gleichen Schritt nur 5% austritt.

Bei Betrachtung von Abb. 2 fällt ferner der Unterschied der Ablösbarkeit der Creatinkinase aus Ratten- und Taubenmitochondrien auf. Während der 0,01M PO_4 -Puffer bei Rattenmitochondrien bessere Ablösung bewirkt, erfolgt die Ablösung bei Taubenmitochondrien besser im stärker konzentrierten Puffer. Dieser Befund ließ zweifelhaft werden, daß die Ablösung der CK allein auf der osmotischen Aggressivität des Inkubationsmediums beruhe.

a. Einfluß der Osmolarität?

Es wurden deshalb an Rattenherzmitochondrien vergleichende Untersuchungen mit nicht-ionischen und ionischen Lösungen durchgeführt. Verglichen wurde die Freisetzung der mitochondrialen CK und der MDH bei Inkubation in Saccharose-Medium, in TEA-Puffer und in PO_4 -Puffer. Die in Tab.4a wiedergegebenen Befunde zei-

Extraktion	MDH [$\frac{\mu\text{Mol DPNH}}{\text{min g Prot}}$]	CK [$\frac{\mu\text{Mol DPNH}}{\text{min g Prot}}$]
0,1M PO ₄	12000	1080 (100%)
+Ultra-Turrax		
0,3M Saccharose	132	18 (1,7%)
0,2M "	198	15
0,1M "	228	10
0,03M "	252	0
0,3M TEA-Cl	306	144 (13%)
0,2M "	312	126
0,1M "	372	138
0,01M "	414	162
0,3M PO ₄	354	354 { 33% }
0,2M "	276	522 { 48% }
0,1M "	330	840 { 78% }
0,03M "	420 (3,5%)	1020 { 94% }

Tab. 4a: Ablösung der Creatinkinase aus Herzmitochondrien der Ratte.
 Inkubation in den angegebenen Extraktionsmedien für
 30 Minuten bei 0°C. pH=7,2 (Saccharose mit 5mM TEA-Cl
 eingestellt). Mitochondrieneinsatz: 1,39mg Prot/ml.

gen deutlich. daß hypotonische Saccharoselösungen nur geringe Enzymelution bewirken, während TEA-Puffer eine mäßige und PO_4 -Puffer geringer Osmolarität eine sehr gute Elution bewirken. Die Enzymablösung geht also der Osmolarität nicht parallel.

b. Spezifischer Phosphateffekt?

Zu klären war weiter, ob die Freisetzung der Creatinkinase aus Mitochondrien spezifisch durch PO_4 -Ionen begünstigt wird. Tab. 4b gibt einen Vergleich der Wirkung von PO_4^- , SO_4^- , und Cl^- -Ionen auf die Ablösung der CK aus Taubenbrustmuskel-Mitochondrien wieder. Die Tabelle zeigt, daß die Wirkung der untersuchten Ionen sehr ähnlich ist. Ein spezifischer Phosphat-Effekt ist nicht erkennbar. Eine Parallelität mit der Ionenstärke der verwendeten Medien läßt sich nicht zeigen.

Aus unveröffentlichten Versuchen von SCHWALBACH [106] geht hervor, daß mitochondriale Schwellungsvorgänge mit starker Protein- und Enzymausschwemmung einhergehen. Erst nach diesem heraus-lösenden Vorgang dürfte die Ionenstärke des Inkubationsmediums für die Löslichkeit des Enzyms entscheidend sein.

Tab. 4b erklärt auch, daß Mitochondrien nicht - wie vielfach geübt - in isotonischem (0,13M) KCl-Medium isoliert werden dürfen, wenn ihre ablösbaren Enzyme studiert werden sollen: 0,1M KCl-Lösung löst ca. 90% der Creatinkinase von Taubenbrustmuskel-Mitochondrien heraus.

2. Bindung von Lactatdehydrogenase in Mitochondrien.

Hingewiesen werden muß auch auf Gehalt und Bindungsfestigkeit der Lactatdehydrogenase (LDH), die immer in kleiner Aktivität in isolierten Mitochondrien nachzuweisen war. Rattenskelettmuskel-Mitochondrien zeigten den kleinsten Gehalt: 15µMol DPNH/min.g m-Prot, Rattenherz-Mitochondrien folgen mit 25µMol/min.g,

Extraktion	MDH[$\frac{\mu\text{Mol DPNH}}{\text{min.gProt.}}$]	LDH	CK	%Prot.v.Eins. gelöst.	Osmolarität	Ionenstärke
0,1M PO ₄ +Turrex ⁴	9120	126	1560(100%)	25%	0,27	0,24
0,3M Sacch.	124	0	10(0,6%)	1%	0,30	0,01
0,1M PO ₄	324	54	1270(82%)	6%	0,27	0,24
0,01M "	198	24	25(2%)	3%	0,027	0,024
0,1M SO ₄	372	60	1420(90%)	7%	0,30	0,30
0,01M "	402	42	138(9%)	6%	0,03	0,03
0,1M Cl	474	72	1350(87%)	5%	0,20	0,10
0,01M "	240	48	35(2%)	4%	0,02	0,01

Tab.4b: Abhängigkeit der Ablösbarkeit der Creatinkinase aus Taubenbrust-Mitochondrien von dem Einfluß verschiedener Anionen. Inkubation in den angegebenen Inkubationsmedien für 30 Minuten bei 0°C. pH=7,2 (Saccharose s.Tab.4a).
Mitochondrieneinsatz: 1,21 mg Protein/ml.

während Hirnmitochondrien mit $50\mu\text{Mol}/\text{min.g}$ die höchste Aktivität unter den untersuchten Rattenmitochondrien aufweisen.

Bei dem relativ hohen LDH-Gehalt in Hirnmitochondrien ergab sich die Frage, ob die "mitochondriale" LDH-Aktivität einen wesentlichen Anteil der Gesamtktivität ausmacht. Nach DELBRÜCK et al. [28] ist der LDH-Gehalt von Rattenhirn $55\mu\text{Mol}/\text{min.g}$ fr. Bei Umrechnung mit dem Cyt.a-Faktor nach SCHOLLMMEYER u. KLINGENBERG [105] ergibt sich der mitochondriale Gehalt als $0,89\mu\text{Mol}/\text{min.g}$ fr. Das entspricht 2% der Gesamtktivität.

Die angegebenen LDH-Aktivitäten wurden beobachtet an Mitochondrien, aus denen durch Saccharose-Waschung keine LDH mehr eluiert werden konnte. Erst durch Inkubation in Phosphatpuffern, Desintegration in Phosphat mit dem "Ultra-Turrax"-Homogenisator oder mit dem Ultraschallgerät "Branson-Sonifier" konnte diese LDH-Aktivität freigesetzt werden. Da die Aktivitäten der CK nach Desintegration mit dem "Ultra-Turrax" bestimmt wurden, sind auch die oben angegebenen LDH-Werte der Rattenmitochondrien auf diese Methode bezogen.

Tab.5 zeigt die Herauslösbarkeit von LDH aus Skelettmuskelmitochondrien der Ratte - vergleichend sind die Werte für CK und MDH aufgetragen.

Wenn man annimmt, daß die Enzymextraktion durch Inkubation in Phosphatlösung die leichter gebundenen Enzyme freisetzt, während Enzyme die erst bei mechanischer Desintegration austreten, fester gebunden sind, so muß ein Teil der LDH mit erheblicher Festigkeit an die Mitochondrienstruktur gebunden sein, wie die Tab. 5 zeigt.

Die höchsten Werte für LDH wurden an Tauben-Brustmuskelmithochondrien gefunden, bei denen als nicht-Saccharose-extrahierbare Aktivität $120\mu\text{Mol}/\text{min.g}$ Prot gemessen wurden.

Extraktion	LDH [$\frac{\mu\text{Mol DPNH}}{\text{min gProt}}$]	CK	MDH	m-Prot gelöst
0,1M PO ₄ +Turrax	14,4 (100%)	1150	19500	39%
0,3M Sacch.	0,0	0	96	2%
0,1M PO ₄	3,6 (25%)	139	282	6%
0,01M "	7,8 (54%)	155	294	5%
0,1M PO ₄ +Sonifier	15,6 (110%)	582	15300	33%

Tab.5: Ablösbarkeit von Lactatdehydrogenase (LDH) aus Ratten-skelettmuskelmitochondrien. Inkubation in den angegebenen Medien für 30 Minuten bei 0°C. pH=7,2 (Saccharose s. Tab.4a). Turrax-4x30 Sekunden. Sonifier=Branson-Sonifier, Stufe V, 4x10 Sekunden 20 kHz. Mitochondrieneinsatz: 1,1 mg Prot/ml.

3. Proteinasewirkung auf Creatinkinase in Mitochondrien.

Um näheren Aufschluß über den Sitz der leicht aus den Mitochondrien herauslösbaren CK zu bekommen, wurden Inkubationsversuche mit Proteinase durchgeführt. In Vorversuchen war festgestellt worden, daß "Novo"-Proteinase aus *B. subtilis* gereinigte CK aus Kaninchenmuskel und Rohextrakt der CK aus Rattenherzmitochondrien angreift und inaktiviert. Rattenherzmitochondrien wurden in isotonischem Saccharosemedium, das mit 0,05mg/ml "Novo"-Proteinase versetzt war für 5 bzw. 10 Minuten bei 0°C inkubiert. Die Inkubation wurde durch Abzentrifugieren beendet. Angeschlossen wurde eine Waschzentrifugation in Saccharosemedium. Danach wurden die Mitochondrien in 0,1M PO_4 -Puffer aufgenommen und mit dem "Ultra-Turrax" aufgeschlossen. Die CK-Aktivität wurde am 100000g-Überstand gemessen. Tab.6 gibt die Resultate wieder:

	MDH	CK	LDH[$\frac{\mu\text{Mol DPNH}}{\text{min gProt}}$]
t_0	9900	1040(100%)	17
t_5	9850	755(73%)	14
t_{10}	9850	595(57%)	11

Tab.6: Proteinasewirkung auf Creatinkinase in Rattenherzmitochondrien. 0,05mg "Novo"-Proteinase/ml. Mitochondrieneinsatz: 1,1mg Prot/ml. Temp.: 0°C. 0,3M Saccharose-Medium mit 10mM TEA-Puffer, pH=7,2. Einwirkung: 0(Kontrolle), 5 und 10 Minuten.

Die Werte zeigen, daß ein großer Teil der CK in einem Proteinase-zugänglichen Bereich der Mitochondrien lokalisiert sein muß. Die Malatdehydrogenase dagegen wird nicht durch die Proteinase erreicht. Der Proteinase-zugängliche Bereich der Mitochondrien kann die äußere Oberfläche der Mitochondrien sein, eventuell auch der mit der äußeren Oberfläche in Verbindung stehende intra-cristale Raum.

4. Vergleich elektronenmikroskopischer Aufnahmen von Mitochondrien.

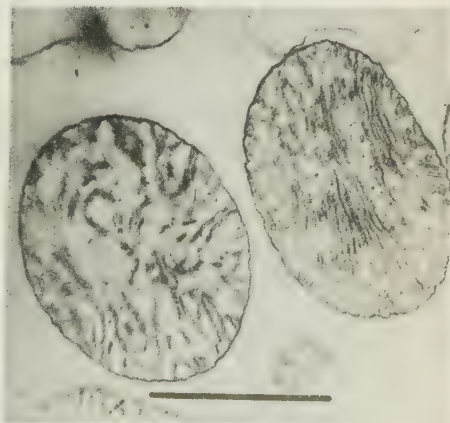
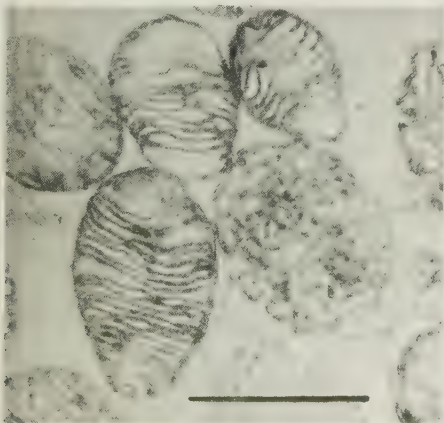
Auch der Vergleich elektronenmikroskopischer Aufnahmen von isolierten Rattenherzmitochondrien wurde herangezogen, um zu klären, wo die mitochondriale CK lokalisiert sein könne.

Herzmitochondrien, die nach Isolierung in isotonischer Saccharose mit OsO_4 fixiert wurden, dienten als Normalbild bei der Gegenüberstellung mit Herzmitochondrien, die nach 30 Minuten Inkubation bei 0°C in $0,1\text{M PO}_4$ -Puffer pH 7,2 fixiert wurden.

An den PO_4 -inkubierten Mitochondrien fallen folgende Veränderungen gegenüber dem Normalbild auf:

- 1.) Ablösung der "dritten" Membran
- 2.) Aufhellung der intracristalen Räume
- 3.) Schwellung des Mitochondriums und Aufhellung der Matrix.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen stützen die Deutung, die bei den Proteinase-Experimenten angenommen wurde: Bei der PO_4 -Inkubation kommt es zu einem Verlust von Material der Oberfläche und der intracristalen Räume. Eine Lokalisation im Matrixraum der Mitochondrien wird als weniger wahrscheinlich angesehen.



11. Abb. 3a: Rattenherzmitochondrien, in $0,3\text{M}$ Saccharose isoliert und mit OsO_4 fixiert.
- re. Abb. 3b: Rattenherzmitochondrien, in $0,3\text{M}$ Saccharose isoliert, anschließend für 30 min. in $0,1\text{M PO}_4$ -Puffer (pH 7,2) bei 0° inkubiert und dann mit OsO_4 fixiert.
- Aufnahmen: Doz. Dr. W. VOGELL, Marburg⁴

III. Charakterisierung der Creatinkinase von Mitochondrien als mitochondriales Isoenzym.

Enzyme gleicher Wirkung, die im gleichen Organismus und im gleichen Organ vorkommen, sich aber durch physikalische, biochemische und immunochemische Methoden voneinander trennen lassen, werden als "Isoenzyme" bezeichnet [79,119,122].

Untersuchungen über Malatdehydrogenase (MDH) und Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), Enzyme, die im cytoplasmatischen und im mitochondrialen Zellraum lokalisiert sind [21,27], haben gezeigt, daß grundlegende Unterschiede zwischen den cytoplasmatischen (c-) und mitochondrialen (m-) Formen dieser Enzyme bestehen. Die c-Form und die m-Form [8] dieser Enzyme haben unterschiedliche kinetische Konstanten [8;84] und lassen sich durch elektrophoretische [6;121] und chromatographische [115,116;5,6] Methoden voneinander trennen. C- und m-Form von MDH und GOT sind nach der gegebenen Definition Isoenzyme.

Nachdem von uns gesichert war, daß neben der bekannten Creatinkinase des Cytoplasmas CK auch in Mitochondrien in hoher Aktivität vorhanden ist, stellte sich die Frage, ob sich beide Aktivitäten - ähnlich wie bei MDH und GOT - als Isoenzyme unterscheiden lassen.

Vorversuche an Extrakten aus Taubenbrustmuskeln und aus Mitochondrien dieses Muskels mit Chromatographie an DEAE-Sephadex-Säulen bestätigten die Vermutung: Die mitochondriale Aktivität erschien im Vorlauf, während die cytoplasmatische Aktivität erst beim Anstieg des EDTA-Ionenstärke-Gradienten eluierbar war. [H. Jacobs u. F. Sauer 1963, unveröff.].

Zur Zeit dieser Untersuchungen wurde die Heterogenität der cytoplasmatischen CK entdeckt: Mit Hilfe der Agaroselektrophorese konnte BURGER [12,13] das Vorhandensein verschiedener cytoplasmatischer Isoenzyme der CK nachweisen.

1. Isoenzymtrennung durch Elektrophorese.

a. Agar-Gel-Elektrophorese.

Die Untersuchungen wurden mit der Methode der Agargel-Elektrophorese fortgesetzt, die sich als rascher und billiger als die chromatographische Isoenzymanalyse erweis. Bei der Technik der Agargel-Elektrophorese stützten wir uns auf frühere Arbeiten von WIEME [123] und KÜCHEMANN [70], die an diesem Institut durchgeführt wurden und auf die Angaben von BURGER [13]. Bei der Elektrophorese auf Agargel wurden vergleichend eingesetzt: Gesamtextrakte aus Organen, cytoplasmatische Extrakte aus Organen und Extrakte aus isolierten Mitochondrien. Durch die vergleichende Elektrophorese war es möglich, die im Gesamtextrakt nachweisbaren Isoenzyme der CK dem cytoplasmatischen und dem mitochondrialen Zellraum zuzuordnen. Abb.4a,4b, und 4c geben Elektrophoresen von Enzymextrakten aus Rattenorganen und ihren isolierten Mitochondrien wieder.

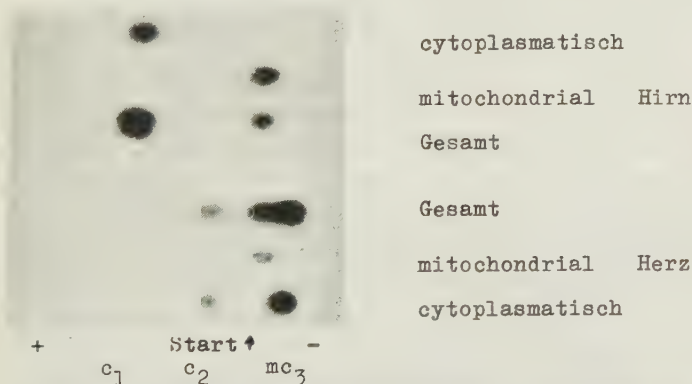


Abb.4a: Agargel-Elektrophorese von cytoplasmatischen, mitochondrialen und Gesamtextrakten aus Hirn und Herz der Ratte. Trennung bei 0°C, 150V, 30-50 mA, 45 min. Laufzeit. 0,8% Reinagar mit TRIS-Cl Puffer pH 9,0. Anfärbung der CK nach BURGER [13].

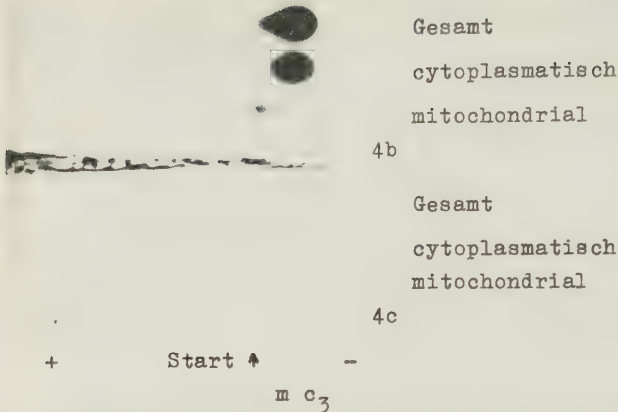


Abb.4b: Agargel-Elektrophorese von cytoplasmatischen, mitochondrialen und Gesamtextrakten aus Skelettmuskel der Ratte. Trennung bei 0°C, 150V, 30-50mA, 45min. Laufzeit. 0,8% Reinagar mit TRIS-Cl-Puffer pH 9,0. Anfärbung der CK nach BURGER [13].

Abb.4c: Blindwert. Einsätze analog 4a, nur bei der Anfärbung Substrat Creatin fortgelassen.

Die Verteilung der cytoplasmatischen Isoenzyme c_1 , c_2 und c_3 in Hirn, Herz und Skelettmuskel der Ratte entspricht den von BURGER [13] beschriebenen Verhältnissen. Wir können durch unsere Resultate seine Angaben bestätigen. Zusätzlich zu den von BURGER entdeckten Isoenzymen c_1 , c_2 und c_3 findet sich in den Gesamtextrakten der Rattenorgane ein Isoenzym, das auf Agargel bei pH-Werten zwischen 7-9 nur ganz gering kathodisch wandert. Dieses Isoenzym der Gesamtextrakte ist positionsgleich mit dem Enzym der entsprechenden Mitochondrien. Es wird dadurch als das mitochondriale Isoenzym "m" charakterisiert. Während die cytoplasmatischen Isoenzyme der drei Rattenorgane starke Unterschiede der elektrophoretischen Mobilität untereinander zeigen, ist auffällig, daß die mitochondrialen Isoenzyme bei den verschiedenen Organen als untereinander gleich erscheinen.

Die Bildhälfte 4c zeigt den zu Abb. 4b gehörigen Blindwertlauf. Es wurden die gleichen Extrakte wie bei 4b aufgebracht und auf einer gemeinsamen Platte elektrophoretisch getrennt. Bei der anschließenden optisch-enzymatischen Sichtbarmachung der Isoenzyme wurde bei 4c das spezifische Substrat Creatin weggelassen. Abb.4c beweist, daß in 4b nur Creatinkinase spezifisch sichtbar gemacht wurde.

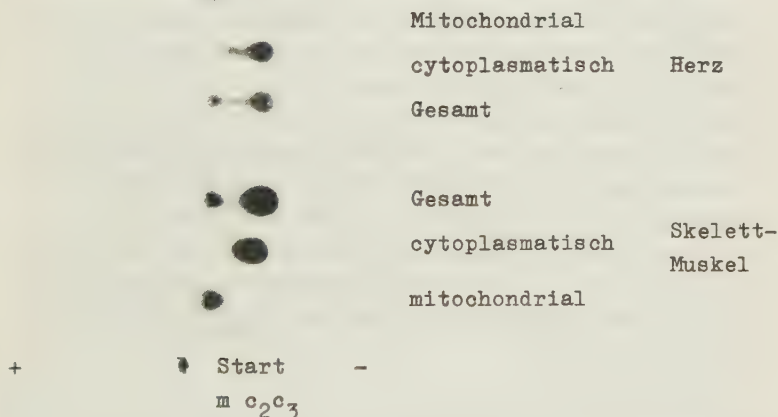


Abb.5: Agarose-Elektrophorese von cytoplasmatischen, mitochondrialen und Gesamtextrakten aus Herz und Skelettmuskel der Taube. Trennung bei 0°C, 150V, 30-50mA, 45min.Laufzeit.0,8% Reineagar mit TRIS-Cl-Puffer pH 9,0. Anfärbung nach BURGER[13].

Abb.5 zeigt die elektrophoretische Auftrennung der CK aus Taubenherz und Taubenbrustmuskel. Taubenherzmuskel hat drei Isoenzyme, von denen zwei kathodenwärts wandernde Banden, c₂ und c₃, dem cytoplasmatischen Raum entstammen, während die nur geringfügig vom Start verschobene Bande m mitochondrialen Ursprungs ist. Taubenbrustmuskel hat zwei Isoenzyme der CK - ein cytoplasmatisches, kathodisch wanderndes (c₃) und ein startnahes, mitochondriales Isoenzym (m).

Vergleicht man die Agargel-Elektrophoresen der Abb. 4-5, so fällt auf, daß die mitochondrialen Isoenzyme der CK nicht nur bei den Organen der Ratte untereinander übereinstimmen, sondern daß auch m-CK von Ratte und Taube gleiches elektrophoretisches Verhalten zeigen.

b. Agarose-Gel-Elektrophorese.

Der zur Agargel-Elektrophorese verwendete Reinagar ist ein Polysaccharidgemisch, das zu ca. 50% aus der Polygalaktose Agarose und zu 50% aus dem Polygalaktosesulfat Agaro-pektin besteht [49]. Der Agaropektin-gehalt von Reinagar bedingt gewisse Störungen der Elektrophorese: Endosmotische Verlagerung der getrennten Fraktionen und unspezifische Verzögerung durch Wechselwirkungen mit den Sulfatresten des Agaropektins. Ein Verfahren zur Reindarstellung des Agarose wurde von HJERTEN [49] entwickelt. Reine Agarose erschien erstmals Ende 1964 im Handel. Mit dem neuen Trägermaterial führten wir Elektrophoresen durch um die früheren Versuche mit Reinagar zu überprüfen. Abb.6 zeigt eine Agarosegel-Elektrophorese:

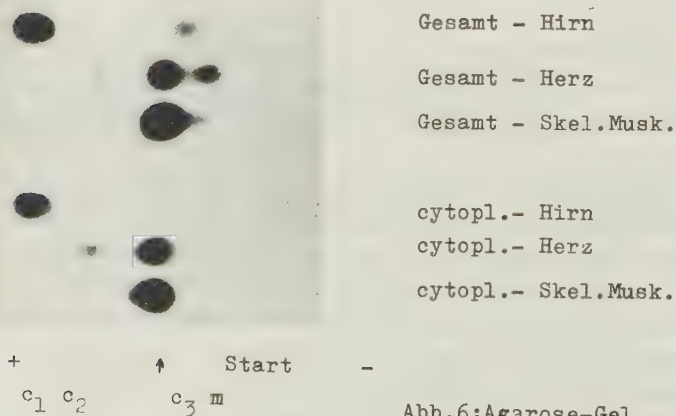


Abb.6: Agarose-Gel
Elektrophorese.

Abb.6: Agarose-Gel-Elektrophorese von cytoplasmatischen und Gesamtextrakten aus Hirn, Herz und Skelettmuskel der Ratte. Trennung bei 0°C, 150V, 30-50mA, 30min. Laufzeit. 0,4% Agarose mit TRIS-Cl-Puffer pH 9,0. CK-Anfärbung nach BURGER [13]

Es wurden Gesamtextrakte und cytoplasmatische Extrakte aus Hirn, Herz und Skelettmuskel der Ratte zur Elektrophorese eingesetzt. Im Wesentlichen stimmen die Resultate der Elektrophoresen auf Agar und auf Agarose überein. Die Zahl der Isoenzyme ist die gleiche wie auf Agargel. Die Position der Isoenzyme weist dagegen einige Unterschiede gegenüber der Agargel-Elektrophorese auf: das Isoenzym c_3 wandert hier nicht kathodenwärts, sondern bleibt an der Startposition. Dagegen zeigt die m-CK auf Agarose stärkere kathodische Beweglichkeit. Auf Agarose ist die vorher für Agargel beschriebene elektrophoretische Einheitlichkeit der m-CK nicht mehr zu beobachten. Zwar ist die kathodische Wanderung der mitochondrialen Isoenzyme nur gering, jedoch ist ein deutlicher Unterschied zwischen m-CK aus Hirn und m-CK aus Herz feststellbar.

2. Isoenzymtrennung durch Ionenaustauschchromatographie.

Ein Nachteil der Isoenzymanalyse auf Agar- bzw. Agarosegel liegt darin, daß sich die Methode nicht quantitativ auswerten läßt. Die Fleckengröße hängt nicht nur von der Aktivität des Enzyms ab, sondern auch ganz wesentlich von Diffusionsvorgängen. Dieser Nachteil entfällt bei der Isoenzymtrennung an Cellulose-Ionenaustauschern. Die chromatographische Methode kann quantitativ ausgewertet werden und ist auch für präparative Zwecke geeignet.

Zur Chromatographie wurde TEAE-Cellulose, ein schwacher Anionenaustauscher verwendet. Die Elution wurde mit einem linearen NaCl-Gradienten bei pH 7,5 [117] durchgeführt. Mit Hilfe eines

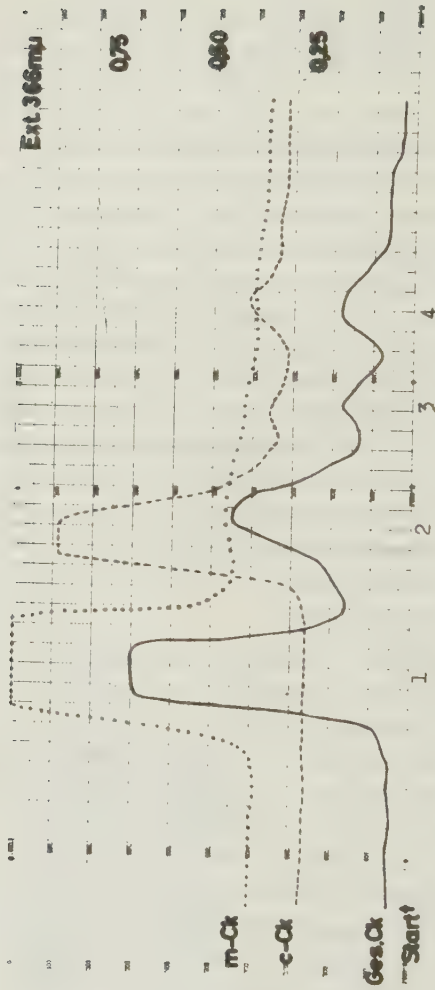


Abb. 7: Chromatographische Trennung der CK-Isoenzyme aus Rattenherzmuskel an TEAE-Cellulose. Gradient 10mM TRIS-Cl pH 7,5 linear nach 10mM TRIS-Cl + 1M NaCl, pH 7,5. Säule 0,5 x 20cm. Durchfluß 3,2ml/h. Kontinuierliche Registrierung der CK nach KADENBACH (s. Methodik). Einsatz: Gesamt-CK=1,1μMol/min, cytoplasmatische CK = 0,7μMol/min, mitochondriale CK = 2,4μMol/min. Laufzeit vom Start bis Ende 6h.

von KADENBACH [58] entwickelten Systems wurden am Eluat der Austauschersäule kontinuierlich der Eiweissgehalt - durch Messung der Absorptionsänderung bei 280m μ - und die Enzymaktivität der CK - durch Messung der Extinktionsänderung bei 366m μ nach 5min. Inkubation von 1Vol. Eluat und 1Vol. Testgemisch bei 25°C - registriert. Synchron wurde kontinuierlich die Blindwertaktivität der Adenylatkinase und der ATPase verfolgt.

Abb.7 zeigt die Darstellung von 3 Chromatogrammen an TEAE-Cellulose. Die CK-Aktivitätskurven von drei unter identischen Bedingungen durchgeführten Chromatogrammen sind zum Vergleich auf einer Abb. zusammengefaßt. Die Spur "Ges.CK" zeigt die Auftrennung eines Gesamtexttrakts aus Rattenherzmuskel mit kontinuierlicher Registrierung der CK-Aktivität. Die Spur "c-CK" zeigt die Auftrennung eines cytoplasmatischen Extrakts aus Rattenherzmuskel. Man sieht, daß die Aktivitätsgipfel positionsgleich sind mit dem 2., 3. und 4. Gipfel der Gesamtextrakt-trennung. Auf der Spur "m-CK" ist die Auftrennung eines Extrakts aus Rattenherzmitochondrien wiedergegeben: Der Aktivitätsgipfel zeigt gleiche Lage wie der Gipfel 1 des Gesamtexttrakts, der deshalb als mitochondrial angesehen wird.

Gipfel 1, der das mitochondriale Isoenzym enthält, läßt sich ohne Ansteigen des Ionenstärkegradienten eluieren, gehört also als nicht anionisch gebundenes Protein dem Vorlauf des Chromatogramms an. Gleiches Verhalten wurde auch für die m-CK-Fraktion von Taubenbrustmuskel, von Taubenbrust-Mitochondrien und von Rinderherzmitochondrien beobachtet. Da m-MDH und m-GOT analoges Verhalten in der Anionenaustausch-chromatographie zeigen, ist ein weiteres Argument für die Existenz einer echt mitochondrialen Form der CK gegeben.

Die angestrebte quantitative Auswertung der automatisch registrierten Enzymchromatogramme war nicht möglich, da die Apparatur nach KADENBACH zur Zeit dieser Versuche noch nicht weit genug entwickelt war. Der jetzige Stand der automatisierten Chromatographie erlaubt nur Angaben über die Position der Isoenzyme der CK und über ihre relative Größe. Durch Planimetrie der Kurve "Ges.CK" kann man den Anteil der einzelnen Isoenzymgipfel an der Gesamtaktivität angeben:

Gipfel	1	2	3	4
Anteil	48,5%	34,2%	7,2%	9,8%

Der durch die Chromatographie ermittelte Anteil der mitochondrialen CK an der Gesamtaktivität stimmt gut überein mit der Bestimmung aus isolierten Mitochondrien und ihrem über den Cytochrom-Faktor ermittelten Anteil an der Gesamtaktivität. (Tab.2). Auch die Summe der Fraktionen III und IV zeigt für Herzmuskel in der fraktionierten Extraktion diesen Wert (Tab.3b).

IV. Untersuchung zur Funktion der Creatinkinase in intakten Mitochondrien.

1. Bildung von Creatinphosphat durch Mitochondrien.

Bei Studien über den Einbau von $^{32}\text{PO}_4$ in mitochondriale Verbindungen wurde zuerst von HELDT [44] die Creatinphosphatbildung durch isolierte, atmende und phosphorylierende Mitochondrien beobachtet. Es wurde festgestellt, daß Taubenbrustmuskel- und Rattenherz-Mitochondrien Cr-P bilden. Lebermitochondrien der Ratte zeigten dagegen keine Cr-P-Bildung. HELDT fand, daß 80% des gebildeten Cr-P intramitochondrial vorkommt, nur 20% tritt im Inkubationsmedium der Mitochondrien auf.

Die beobachtete Creatinphosphatbildung war mengenmäßig gering. Es wurde eine Synthese in der Größenordnung von 0,1 nanoMol Cr-P/mg mitochondr. Protein gefunden.

a. Einbau von P^{32} in Creatinphosphat.

Um weiteren Aufschluß über die Funktion des mitochondrialen Creatinkinase-Systems zu bekommen, wurden die Untersuchungen von HELDT fortgeführt. Die mitochondriale Creatinphosphatbildung wurde mit einer verbesserten Methodik der Ionenaustauschchromatographie und der Radioaktivitätsmessung studiert.

Abb.8 zeigt das Ergebnis einer Untersuchung an Taubenbrustmuskelmitochondrien. Es wurden Mitochondrien entsprechend 20,6 mg Protein 3 min. aerob bei 18°C in Gegenwart von 0,3M Sucrose, 5mM Succinat, 5mM Ketoglutarat und 70µC [^{32}P]-Orthophosphat (trägerfrei) in einem Gesamtvolumen von 2ml inkubiert. Die Reaktion wurde beendet durch Zugabe von 0,4ml 3M HClO_4 . Nach dem Abzentrifugieren des Proteinniederschlages wurde die Probe mit 3M KOH auf pH 7 neutralisiert.

Abb.8 gibt die synchrone, automatische Registrierung der UV-Extinktion (265mµ - Nukleotide), des Phosphatgehalts (578mµ - Phosphormolybdänblau) und der P^{32} -

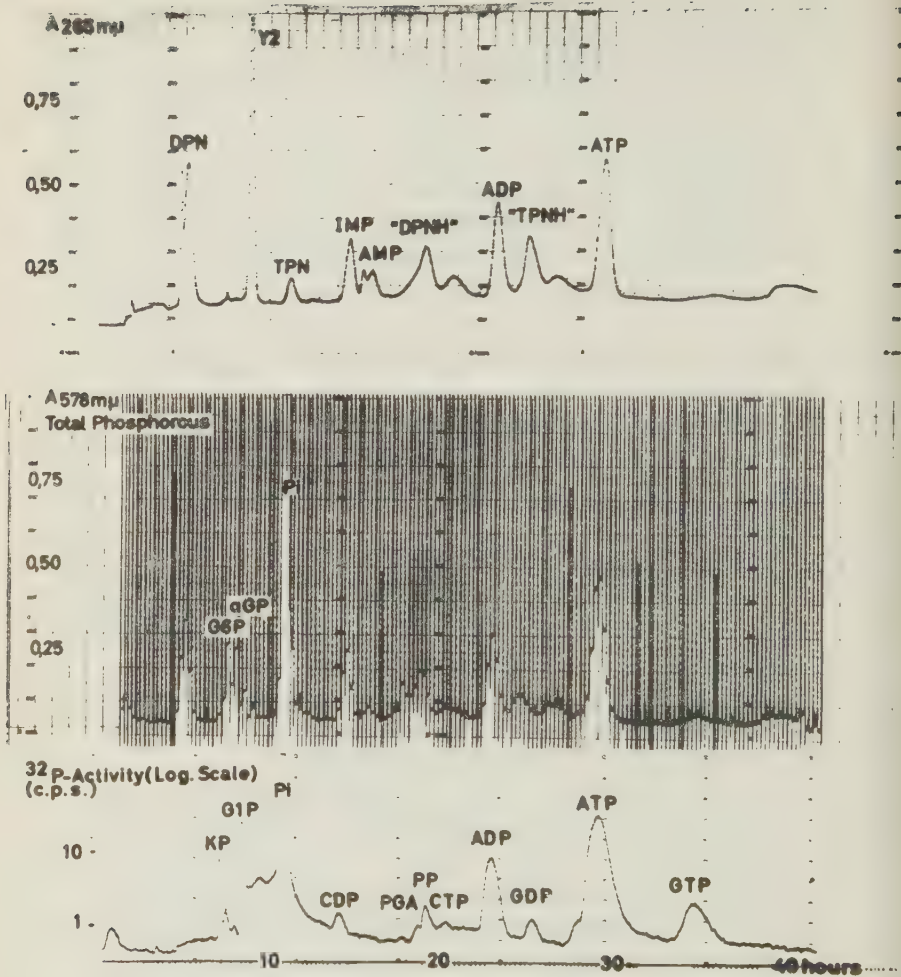


Abb.8: Analyse eines Extraktes aus atmenden und phospho-
lierenden Taubenbrustmuskelmitochondrien durch
Ionenaustauschchromatographie (Inkubation s.Text).
In der Radioaktivitätsregistrierung bei "KP" das
gebildete, P^{32} -markierte Creatinphosphat.
1ml Extrakt entsprechend 7,15mg Protein wurde zur
Chromatographie eingesetzt. Säule: $\varnothing$ 1,1mm, Länge
200cm. Mischflasche: 24ml H_2O . Vorrat: 0,67M $HCOOH$
+ 3,00M $HCOONH_4$. Elutionssystem II (HELDT).

Aktivität wieder. In der Radioaktivitätsregistrierung ist bei "KP" das von den Mitochondrien gebildete, P^{32} -markierte Creatinphosphat erkennbar. (H.W.HELDT und H.JACOBS, 1962 unveröffentl.).

b. Steigerung der Creatinphosphatbildung durch Creatin und ADP.

Eine wesentliche Steigerung der Cr-P-bildung läßt sich zeigen, wenn man Mitochondrien, die in Gegenwart von Substrat und Phosphat atmen und phosphorylieren, Creatin zum Medium zusetzt. Während Cr-P, das Mitochondrien ohne Creatinzusatz - durch Phosphorylierung des endogenen Creatins - bilden, nur in so kleiner Menge vorhanden ist, daß es sich nicht enzymatisch nachweisen läßt, kann bei Creatinzusatz das gebildete Cr-P gut im enzymatischen Test bestimmt werden. Rattenherzmitochondrien bilden ohne Creatinzusatz 0,1 nMol Cr-P/mg Protein [44]. Bei Zusatz von 20mM Creatin zur Inkubation kommt es unter sonst gleichen Bedingungen zur Bildung von 30nMol Cr-P/mg Protein. Das entspricht einer 300-fachen Steigerung. Zufügung kleiner Konzentrationen von ADP führt zu einer weiteren beträchtlichen Steigerung der Cr-P-bildung.

Abb.9 zeigt die Abhängigkeit der Cr-P-bildung von der Creatinkonzentration und vom ADP-Zusatz. Die Abb. zeigt deutlich, daß das mitochondriale CK-System erst im Zusammenwirken mit exogenen (=extramitochondrialen) Adeninnukleotiden seine volle Wirksamkeit erlangt.

c. Einfluß von Magnesium.

Auch der endogene Mg^{++} -gehalt genügt nicht zur vollen Aktivierung des Systems. Bei Zusatz von 2mM freiem Mg^{++} wurde bei Rattenherzmitochondrien die stärkste Creatinphosphatbildung beobachtet. Bei weiterer Steigerung sinkt die Cr-P-bildung wieder ab, da dann die Aktivität der Mg^{++} -stimulierten ATPase stark zunimmt.

Creatinphosphatbildung durch isolierte Herzmitochondrien

Inkubationszeit: 3 min, Temperatur: 20° C.

Inkubationsmedium: 0,3 M Sucrose, 10 mM TRA-Puffer, 1 mM EDTA, 1 mM Phosphat, 2 mM Succinat, 2 mM Ketoglutarat, 3 mM Mg⁺⁺.

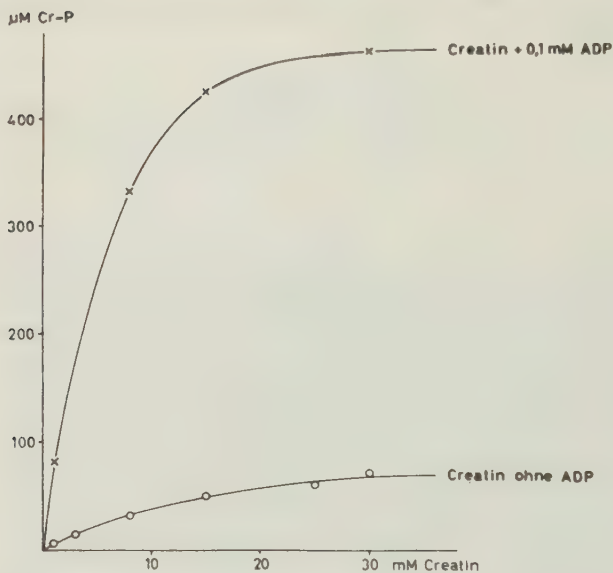


Abb. 9: Steigerung der Cr-P-bildung durch Creatin und ADP. Zusätze wie bezeichnet. pH= 7,2.

Steigerung und Hemmung
der mitochondr. Cr-P-Bildung
durch Mg⁺⁺

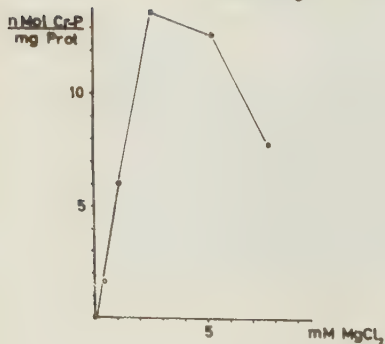


Abb. 10: Einfluß von Mg.
Rattenherzmitoch.
je 1 mM Succ., Kg.,
PO₄ u. EDTA.
Inkub. 3 min., 20°,
pH 7,2.

Abb.10 gibt den Magnesiumeinfluß auf die Cr-P-Bildung von Rattenherzmitochondrien wieder. Die dargestellten Befunde zeigen, daß das mitochondriale Creatinkinase-System zu einer starken Cr-P-Bildung fähig ist. Die hier in vitro zugesetzten Konzentrationen von Creatin, ADP und Mg^{++} , die maximale Aktivierung bewirken, sind in vivo z.B. in der Herzmuskelzelle in etwa gleicher Konzentration vorhanden [50]. Es ist daraus zu folgern, daß das mitochondriale CK-System bei Dephosphorylierung der Cr-P-Reserven der Zelle aktiv an ihrer Rephosphorylierung teilnehmen wird.

2.Übertragung von Phosphatenergie aus Creatinphosphat auf die Atmungskette.

Auch die Rückübertragung von Phosphatenergie aus zugesetztem Cr-P auf die Atmungskette wurde geprüft. Die von KLINGENBERG u. SCHOLLMEYER [62-65] mit ATP-Zusatz gezeigte Umkehrung der oxidativen Phosphorylierung mit Übergang der reduzierten Cytochrome in den oxidierten Zustand läßt sich auch durch Zugabe von Cr-P zeigen (Abb.11). Die Anwesenheit einer kleinen Menge von exogenem ADP ist allerdings Vorbedingung für den Ablauf der Reaktion.

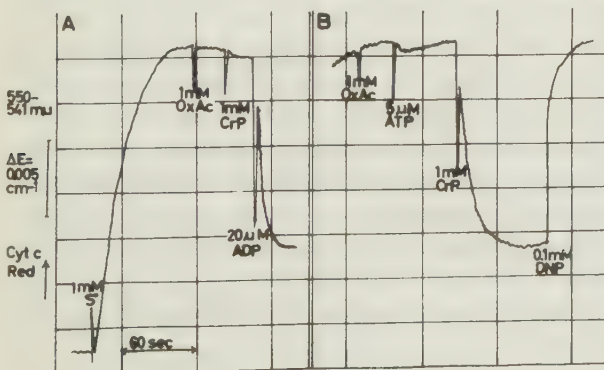


Abb.11

Abb.11: Übertragung von Energie aus zugesetztem Cr-P auf den Cytochrom-Bereich der Atmungskette isolierter Rattenherzmitochondrien. Direkt-Registrierung mit dem Doppelstrahlspektrophotometer. (Aus B.Chance[Edit.] "Energy-linked functions of mitochondria", Acad.Press, New York 1963, nach M.KLINGENBERG u. H.JACOBS).

Abb.11 zeigt die Registrierung des Redoxzustandes von Cytochrom c in intakten Rattenherzmitochondrien. Die Messung erfolgte mit dem Doppelstrahlspektrophotometer [c.f.61]. In der Bildhälfte A ist die Atmung der Mitochondrien durch Sulfid gehemmt: Die Cytochrome werden von der Substratseite der Atmungskette her reduziert. Oxalacetat wird als Wasserstoffacceptor zugefügt. Zusatz von 1mM Cr-P führt nur zu einer geringen Oxidation. Werden aber weiter 20µM ADP zugesetzt, so wird durch Übertragung der Phosphatenergie aus Cr-P das Cyt.c weitgehend oxidiert. Die Bildhälfte B zeigt, daß auch ATP als übertragendes exogenes Adenin-nukleotid zugegeben werden kann. 5µM ATP führen zu einer geringen Oxidation. Das ATP wird zu ADP dephosphoryliert. Setzt man 1mM Cr-P zu, kommt es wieder zu einer weitgehenden Oxidation des Cytochrom c. 0,1mM Dinitrophenol führt durch ATPase-stimulierung zum Zerfall der aufgestauten energiereichen Zwischenprodukte der oxidativen Phosphorylierung: Cyt. c geht wieder in den reduzierten Zustand über.

Eine Energieübertragung auf den Pyridinnukleotid- und den Flavinnukleotidbereich der Atmungskette konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Daß der Angriff des Cr-P nicht auf den Phosphorylierungsbereich der Cytochrome beschränkt ist, zeigen neueste Ergebnisse von KRÖGER [71], der Energieübertragung aus Cr-P auf das Ubichinon der Atmungskette beobachtete.

Das Phänomen der Rückübertragung von Phosphatenergie aus äußerem Cr-P auf die Atmungskette zeigt, daß das mitochondriale CK-System auch funktionell reversibel arbeitet.

V. Versuche zur Reinigung des Enzyms.

Für die weitere Untersuchung des isolierten Enzyms ist seine Reinigung erforderlich. Nur mit gereinigten Präparaten ist die exakte Bestimmung des Molekulargewichts und der kinetischen Konstanten, sowie die immunochemische Charakterisierung möglich. Es wurde deshalb die Entwicklung eines Reinigungsganges für die mitochondriale CK versucht.

1. Vorreinigung.

Als Ausgangsmaterial für die präparative Enzymdarstellung wurde Rinderherzmuskel benutzt. Durch Isolierung der Mitochondrien wird der Großteil der cytoplasmatischen Proteine zurückgelassen. Zudem können Mitochondrien aus Rinderherz in grosser Menge gewonnen werden. Durch Ausnutzung der Eigenschaft der Ablösbarkeit läßt sich eine weitere Vorreinigung erreichen: Ein wesentlicher Teil des inerten mitochondrialen Proteins bleibt bei der Ablösung der m-CK zurück. Der durch Ablösung des Enzyms mit 0,1M PO_4 -Puffer pH 7,2 gewonnene Extrakt wurde als "Rohextrakt" zur Reinigung des Enzyms benutzt. In Rinderherzmuskel ist m-CK mit einer spezifischen Aktivität von 0,14 $\mu\text{Mol/min.mg Prot}$ enthalten. Rohextrakte wurden mit einer spezif. Aktivität von 1 bis 5 $\mu\text{Mol/min.mg Prot}$. erhalten.

2. Instabilität gegen Aethanol.

Auf Grund ihrer hohen Stabilität gegen Aethanol (nach KUBY [66] 60%) läßt sich cytoplasmatische CK aus Kaninchenmuskel durch Aethanolfraktionierung reinigen. Der Versuch m-CK mit der Aethanol-Mg-Methode (procedure B) nach KUBY [66] zu reinigen, scheiterte. Nähere Untersuchung zeigte, daß mitochondriale CK geringere Stabilität gegen Aethanol besitzt. Nach KUBY wird das inerte Protein mit Aethan-

ol gefällt und CK mit Mg^{++} aus dem Überstehenden präzipitiert. Die "Arbeitsbreite" zwischen Fällung des inerten Proteins und Inaktivierung der m-CK ist zu klein. Abb.12 zeigt diese Verhältnisse:

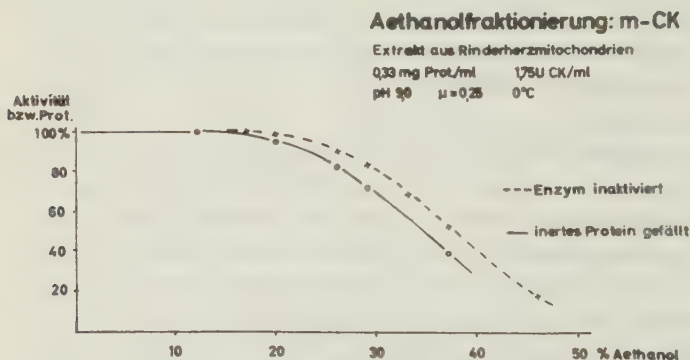


Abb.12: Versuch der Aethanolfraktionierung der m-CK nach KUBY [66]. Die Inaktivierungskurve der m-CK hat nicht den erforderlichen Abstand von der Fällungskurve des inerten Proteins.

3.Aceton- und Ammonsulfatfällung.

Da die Aethanolfraktionierung versagte, wurde die Acetonfraktionierung der CK nach ASKONAS [1] versucht. Auch WOOD[124], der bei der Reinigung der CK aus Ochsenhirn geringe Aethanolstabilität beobachtete, wandte die Acetonmethode an. Acetonfraktionierung ergab bei uns befriedigende Reinigung und gute Ausbeuten. m-CK wurde mit 40% Acetonsättigung aus eingengtem Rohextrakt (4mg Prot./ml) bei pH 9,0 und bei $-15^{\circ}C$ gefällt. Das Sediment wurde in 0,1M PO_4 -Puffer pH 7,2 aufgenommen und bei 1,74M Ammonsulfatsättigung gefällt. (Ammonsulfatfraktionierung [2]). Das beste erhaltene Präparat hatte im Test nach BÜCHER [11]

eine spezifische Aktivität von 22 $\mu\text{Mol DPNH/min.mgProt.}$. Das entspricht, wenn man die Werte des Tests nach BÜCHER et al. auf optimale Testbedingungen umrechnet:

33 i.U./ mg Prot.

Damit erreichte das Präparat eine höhere spezifische Aktivität als nach KUBY kristallisierte Muskel-c-CK der Fa. BOEHRINGER [4]. Das BOEHRINGER-Präparat hat eine spezif. Aktivität von 18 i.U./ mg Prot.

Das Präparat (S40Ac-1,74AS) wurde in analytischem Maßstab für verschiedene Untersuchungen weiterverwandt.

4. Chromatographie an TEAE-Cellulose und Sephadex.

Proben des Präparats S40Ac-1,74AS wurden an TEAE-Cellulose chromatographiert. Die Aktivität zeigt das als typisch für m-CK beschriebene Verhalten: Sie erscheint im Vorlauf, inertes Protein bleibt zurück. Bei Chromatographie von Rohextrakten wurde 5-6fache Reinigung beobachtet.

Im Zusammenhang mit der Frage nach der Existenz eines nativen m-CK-Cyt.c-Komplexes wurden Filtrationsstudien an Sephadex G 75 durchgeführt. Es wurden das Filtrationsverhalten von gereinigtem Cytochrom c_{red} . (MG 14000), von gereinigter c-CK (MG 81000) - beides von der Fa. BOEHRINGER - und von selbst gereinigter m-CK (S40Ac-1,74AS) verglichen. Die beiden Creatinkinase zeigten sehr ähnliches Verhalten bei der Filtration; es wird daraus auf Ähnlichkeit im Molekulargewicht geschlossen. Schlüssige Angaben sind aber erst mit besseren Präparaten und bei Anwendung empfindlicherer Methoden, z.B. der Sedimentationskonstantenbestimmung zu erwarten.

5. Reaktivierung durch Glutathion (GSH).

Bei Aufbewahrung in 0,1M PO_4 -Lösung pH 7,2 bei 0° zeigte das Präparat schlechte Stabilität. Nach 3 Wochen war die Aktivität auf 0% zurückgegangen. Durch Zugabe von GSH ließ sich die Aktivität zu 70% wiederherstellen.

Die Empfindlichkeit der SH-Gruppen des Enzyms ist auffällig. Schon im Beginn der Untersuchungen wurde beobachtet, daß Metallsuren des "Ultra-Turrax"-Homogenisators bei der Extraktion zu starken Aktivitätsverlusten führten. Seither wurden routinemäßig 10mM GSH bei der Extraktion zugesetzt. Dadurch wurden reproduzierbare Aktivitäten erhältlich. Auch die Enzym-Teste auf CK wurden später stets mit frischer GSH-Lösung nachgestartet. Einmaliges längeres Frieren und Wiederauftauen führte nicht zu Aktivitätsverlusten. Daher wurde diese Aufbewahrungsart vorgezogen. Abb.13 zeigt die GSH-Reaktivierung eines Rohextrakts, der bei der Einengung durch Filtrationsdialyse inaktiviert wurde:

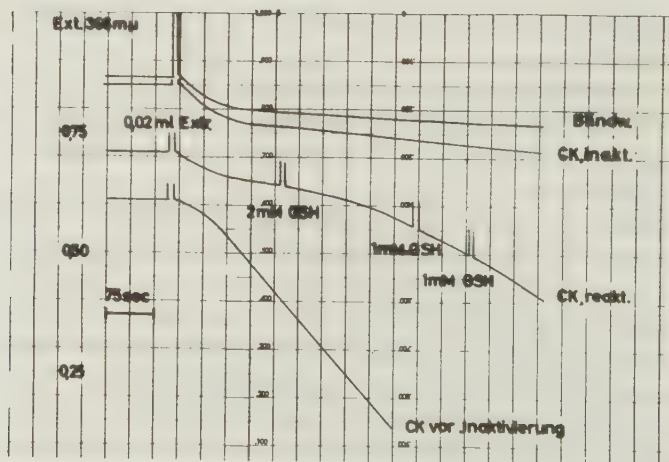


Abb.13: Reaktivierung der CK durch Glutathion (GSH)-Zusatz. Registrierung optisch-enzymatischer Teste auf CK. Vergleich zwischen aktiven, inaktivierten und durch GSH-zugabe reaktivierten Extrakten.

6. Gleichbleiben der elektrophoretischen Mobilität.

Proben des Präparats S40Ac-1,74AS wurden eingesetzt zur Elektrophorese auf Agar- und Agarosegel. Vergleichend wurden Rohextrakt und eine Probe der Fraktion S40Ac eingesetzt. Abb.14a zeigt eine Elektrophorese auf 0,5% Agarose bei pH 9,0. Es ist erkennbar, daß der Reinigungsgang die elektrophoretische Mobilität der m-CK nicht verändert. Eine Verunreinigung des Rohextrakts mit Isoenzym c_3 wird durch den Reinigungsgang entfernt. Unspezifische Aktivität ist nicht nachweisbar.



0,001ml Rohextrakt

0,001ml S40Ac

0,001ml S40Ac-1,74AS

BW Rohextrakt

BW S40Ac

BW S40Ac-1,74AS

+ ↑ Start -
 c_3 m

Abb.14a: Agarose-Gel-Elektrophorese verschieden stark gereinigter m-CK-Präparate aus Rinderherz. Trennung bei 150V, 30-50mA, 25 min. Laufzeit, 0°C. 0,5% Agarose mit TRIS-Cl-Puffer pH 9,0. CK-Darstellung nach BURGER. BW=Blindwert. c_3 =cytoplasm. Isoenzym 3 der CK.m=m-CK.

Da angenommen wurde, die geringe elektrophoretische Beweglichkeit mitochondrialer Enzyme beruhe auf einem Lipoidanteil [118], wurde versucht, durch Abspaltung die

Wanderungsfähigkeit zu beeinflussen.

Nach MORTON [90] wurde Lipoidabspaltung durch Inkubation des Präparats mit 50Vol% n-Butanol bei 0° für 60 Minuten versucht. Die Enzymaktivität und die elektrophoretische Mobilität waren nicht verändert. Auch Behandlung mit Phospholipase A (0,5mg/ml) für 90 min. bei 0°C änderten Aktivität und Mobilität nicht.

Abb.14b gibt die zugehörige Elektrophorese wieder.

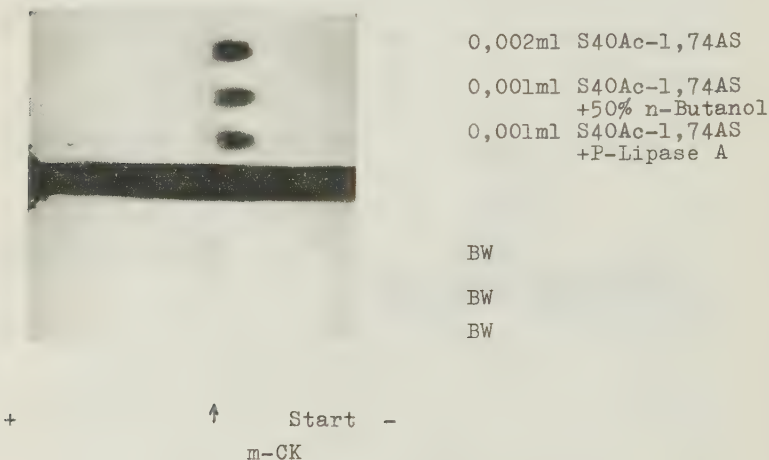


Abb.14b: Agarose-Gel-Elektrophorese von m-CK aus Rinderherz. Eingesetztes, gereinigtes Präparat, Präparat in 50% n-Butanol und Präparat P-Lipase behandelt. Trennung bei 150V, 30-50 mA, 0°C und 45min. Laufzeit. 0,4% Agarose mit TRIS-Cl-Puffer pH 9,0. CK-Darstellung nach BURGER.

7. Spektrum.

Für das ADP-ATP-Austauschenzym der Mitochondrien haben GLAZE und WADKINS [41] Aktivierung durch Cytochrom c beschrieben. LATURAZE u. VIGNAIS [72] haben gezeigt, daß das Enzym bei der Reinigung von Rohextrakt an Säulen von Sephadex und DEAE-Sephadex immer gemein-

sam mit Cyt. c wandert. Sie schlossen daraus auf das Vorliegen eines nativen Komplexes von Cyt. c und ADP-ATP-Austauschenzym. Auch m-CK wandert in Rohextrakten gemeinsam mit Cyt.c auf Säulen von Sephadex G 75 und TEAE-Cellulose. Zur Klärung der Frage, ob m-CK als Cyt.c-Komplex vorliegt, wurden Spektren von den verschiedenen Extrakten geschrieben. Der Rohextrakt und das bei 40% Aceton sedimentierte Protein haben charakteristische Cytochrom c-Spektren. Der Cyt.c-Anteil von S40Ac wird durch die Ammonsulfatfraktionierung entfernt. Bei 1,74M Ammonsulfatsättigung wird die m-CK nahezu quantitativ gefällt, während Cytochrom c im Überstand bleibt.

Das Spektrum des Präparats S40Ac-1,74AS zeigte nur noch kleinste Spuren von Cyt.c. Sonst war das Spektrum des sichtbaren Lichtbereichs leer. Durch die Entfernung von Cyt.c wurde die Aktivität der m-CK nicht verringert. Zugabe von Cytochrom c_{red.} und von Ascorbat erhöhte die Aktivität des Präparats im Test nicht. Mithin bildet m-CK keinen aktiven Cyt. c-Komplex.

Das UV-Spektrum zeigt einen breiten Gipfel mit Maximum bei 275-280 mμ. Bei 290 mμ beginnt die Schulter.

Experimentelle Methoden

1. Isolierung von Mitochondrien.

Zur Gewinnung von Mitochondrien wurden vorwiegend Wistar-Ratten (150-250g, nur männliche Tiere) und blaue Haustauben benutzt. Nach Töten der Tiere durch Entbluten wurden die benötigten Organe sofort entnommen und in eisgekühltes, isotonisches Saccharosemedium übertragen (0,3 M Saccharose, 0,01 M TRA-Puffer, 0,002 M EDTA, pH 7,2). Hierin wurden die Organe mit der Schere fein zerschnitten; anschließend wurde das erste, noch bluthaltige Medium vorsichtig dekantiert. Neues Medium wurde nachgegeben (10 g Medium/1 g Organ), und die Mischung wurde portionsweise im Glas-Teflon-Homogenisator nach POTTER schonend homogenisiert. Dieses Verfahren führt bei Leber, Niere und Hirn zu gutem Gewebesaufschluß. Für andere Organe waren zusätzliche Schritte nötig: Taubenbrustmuskel wurde in einem rostfreien Fleischwolf vorzerkleinert, ehe er homogenisiert werden konnte. Für Taubenherz, Rattenherz und Skelettmuskel der Ratte wurde anfangs die Proteinasetechnik nach CHANCE und HAGIHARA [19] benutzt. Da hierbei jedoch das untersuchte Enzym teilweise zerstört wird, wurde die Technik bei Rattenherz und Taubenherz wieder aufgegeben: Diese lassen sich durch Hintereinanderschalten von Potter-Homogenisatoren absteigender Toleranz zufriedenstellend aufschließen. Bei Rattenskelettmuskel wurden Proteinasemenge und Einwirkungszeit gegenüber der Vorschrift von CHANCE und HAGIHARA stark herabgesetzt: 0,5 mg "Novo"-Proteinase aus B.subtilis für 5 Minuten auf 1 g Gewebe in 10 ml Medium. Alle Arbeitsgänge erfolgen bei 0°C.

Die Abtrennung der Mitochondrien aus dem Homogenat geschieht durch Differentialzentrifugation in der Kühlzentrifuge. Nach Abzentrifugieren von größeren Zellresten und Zellkernen bei 10 min.x 400 g werden aus dem Überstand des ersten Laufs die Mitochondrien bei 10 min.x7500g abgetrennt. Rattenskelettmuskelmitochondrien erfordern eine besondere Zentrifugation: Sie werden zwischen 10 min.x500g und 10 min.x16000g sedimentiert. Für die Gewinnung von Hirn-

mitochondrien hat sich uns die Methode von JÖBSIS [56] am besten bewährt. Großpräparationen von Rinderherzmitochondrien wurden nach GREEN [25] mit Verwendung des SZENT-GYÖRGY-Durchlaufsatzes zur Servall-IRC II-Zentrifuge durchgeführt.

Die gewonnenen Mitochondrien wurden im Potter-Homogenisator mit soviel isotonischer Saccharose wie dem ursprünglichen Homogenatvolumen entsprach nachgewaschen und nochmals abzentrifugiert. Diese Waschung wurde 3 mal durchgeführt. Abschließend wurden die Mitochondrien in einem möglichst kleinen Volumen isotonischer Saccharoselösung suspendiert.

2. Extraktion der mitochondrialen Enzyme.

Zur Extraktion der Enzyme wurde Mitochondriensuspension mit dem 10 bis 20fachen Volumen von Phosphatpuffer (0,1 M K-Na-Phosphat + 0,002 M EDTA, pH 7,2) verdünnt und unter sorgfältiger Eiskochsalzkühlung 4 x 30 sec. mit dem "Ultraturrax"-Homogenisator bei 20 000 RPM desintegriert. Da der Ultraturrax Eisenspuren abgibt, die zu starker Inaktivierung der m-CK führen, wurde dem Phosphatpuffer unmittelbar vor dem Homogenisieren frisch neutralisiertes, reduziertes Glutathion zugefügt (ad 10 mM GSH). Das entstandene Mitochondrienhomogenat wurde auf der Spinco-L-Ultrazentrifuge bei 0°C abzentrifugiert: 30 min. x 100 000g. Der klare Überstand wurde als "Extrakt" zu weiteren Untersuchungen verwendet.

Aus der "Extraktion" der Mitochondrien wurde die "Ablösung" mitochondrialer Enzyme entwickelt. Dabei werden die Mitochondrien nur für 30 Minuten bei 0°C im Extraktionspuffer inkubiert - nicht desintegriert - und dann hochtourig abzentrifugiert.

3. Fraktionierte Extraktion von Gesamtgewebe.

Bei der fraktionierten Extraktion von Gewebe wurden die Angaben von DELBRÜCK et al. [27] und BROSEMER et al. [7] benutzt. Es wurde das vereinfachte Verfahren mit 2 Saccharoseextraktionsschritten, 1 Phosphatextraktionsschritt und 1 Desintegrationsschritt in Phosphat angewendet.

Vergleichend wurden Gesamtaktivitätsbestimmungen gemacht, indem Organproben sofort dem Desintegrationsschritt in Phosphat unterworfen wurden. Der Überstand wurde nach hochtourigem Abzentrifugieren für Enzymbestimmungen, Elektrophorese und Chromatographie verwendet. Der l. Saccharose-Extrakt wird in dieser Arbeit als "cytoplasmatischer Extrakt" bezeichnet.

4. Bestimmung der Enzymaktivität.

Die Bestimmung der Enzymaktivität der Extrakte erfolgte nach den im Arbeitskreis BÜCHER [11] entwickelten Methoden für optisch-enzymatische Tests.

In dieser Arbeit verwendete Substanzen:

Creatinhydrat der Fa. Cal.Biochem., USA

Creatinphosphat der Fa. Sigma, USA

Adeninnukleotide und Pyridinnukleotide von den Firmen Sigma, USA, und Boehringer, Mannheim.

Alle weiteren Substrate und Enzyme kamen von Boehringer, Mannheim. Alle übrigen verwendeten Chemikalien waren p.a. Substanzen der Fa. Merck, Darmstadt.

Es wurden regelmäßig an den Extrakten die Aktivität der Creatinkinase, Lactatdehydrogenase und mitochondrialen Malatdehydrogenase gemessen. Zu Kontrollzwecken wurden gelegentlich DPN-spezif. Isocitratdehydrogenase nach GOEBELL u. KLINGENBERG [42], α -Glycerophosphatoxidase n. KADENBACH [57] und die Cytochrome c und a nach SCHOLLMEYER u. KLINGENBERG [105] bestimmt.

Der Creatinkinase-Test nach BÜCHER et al. wird mit Creatin als spezifischem Substrat durchgeführt. In der notwendigen Blindwertbestimmung wird Creatin aus dem Testansatz fortgelassen. Der Blindwert läuft bei mitochondrialen Extrakten stets zweiphasisch: Zuerst läuft die aktivere AdK ab, bis das als Verunreinigung im DPNH enthaltene AMP erschöpft ist, dann wird die mitochondriale ATPase sichtbar.

Der Test wird nicht bei optimalem pH durchgeführt. Die Umrechnung der gemessenen Aktivität auf internationale Einheiten (i.U.) erfordert Anbringung eines Faktors.

Nachstehend wird der Test auf Creatinkinase nach BÜCHER et al. [11] wiedergegeben:

Tra-Puffer	50	mM	Vol.=1ml
EDTA	5	mM	pH =7,6
MgSO ₄	8	mM	t =25°C
DPNH ⁴	0,15	mM	
ATP	3	mM	
Creatin	25	mM	
PEP	0,8	mM	
PK	65	E/ml	
LDH	140	E/ml	Start mit Enzymextrakt.

5. Elektrophoretische Isoenzymtrennung.

Die elektrophoretische Isoenzymtrennung erfolgte auf Agar-Gel oder auf Agarose-Gel. Zur Elektrophorese wurde das von KÜCHEMANN [70] entwickelte Gerät benutzt. Zur Spannungsversorgung diente eine käufliche spannungskonstante Gleichrichtereinheit (Fa.Medcor, Hbg). Der Stromfluß wurde durch Einschalten eines Milliampereometers kontrolliert. Alle Elektrophoresen erfolgten bei 0°C. Der Puffer wurde nach KÜCHEMANN kontinuierlich während der Elektrophorese aus Vorratsgefäßen erneuert.

Als Agar wurde "Reinagar" der Fa.Behringwerke AG Marburg/L. benutzt. Er wurde wie von BURGER [13] beschrieben vorbereitet, mit Puffer gemischt und als 0,8% -ige Lösung in die von KÜCHEMANN [70] entwickelte Elektrophorese-Trägerform gegossen. Schichtdicke: 2mm. Nach dem Erstarren wurde der Deckel der Gußform mit den Aussparungsstiften für die Startlöcher abgenommen. Zur Alterung kam der Träger für 12 Stunden in eine feuchte Kammer von 0°C.

Als Agarose wurde "Agarose-elektrophoresis grade" der Fa.Seravac, Maidenhead, Engl. verwendet.

Agarose wurde 0,4 bis 0,5%ig vergossen. Sonst war die Technik dieselbe wie bei Agar.

Die Proben wurden aus Mikroliterpipetten nach SCHNITGER in die 1.2 μ l fassenden Startlöcher einpipettiert.

auf
Nach der Elektrophorese wurden die Träger Gussrahmen aus Plexiglas aufgeschraubt: Entweder ein Rahmen mit Mittelsteg, der getrennten Aufguß des Reagenzienagars für Haupt- und Blindwert erlaubt oder eine einfacher Rahmen für die ganze Fläche. Der Reagenzienagar zum Nachweis von CK wurde nach BURGER [13] vorbereitet und bei 35°C in einer Schichthöhe von 2mm vergossen. Danach wurde die Doppelschicht aus Elektrophoreseagar und Reagenzienagar für 10-15 min. bei 35°C gewärmt. Anschließend wurden die Isoenzyme der CK auf Grund der von ihnen im gekoppelten Test bewirkten Oxidation des DPNH im Reagenzienagar photographisch nachgewiesen: Die Agarschicht wird - nur unterstützt von einer dünnen Hostaphan-Folie - auf Agfa-Brovira BEH1 Papier übertragen und mit einer UV-Lampe mit Licht von 366 m μ aus 150cm Entfernung für 1-2sec. belichtet.

6. Chromatographische Isoenzymtrennung.

Als Ionenaustauscher wurde TEAE-Cellulose der Fa. Schleicher u. Schüll benutzt. Nach Aufschlännen und Quellen wurde feineres Material durch wiederholtes Dekantieren und Aufschlännen entfernt. Der Austauscher wurde durch sorgfältiges Gießen in 0,5 x 20cm lange Polyäthylenrohre zu Säulen gepackt. Regeneration mit 0,1N HCl; H₂O; 0,1N KOH und H₂O. Danach Aequilibrieren mit dem Elutionspuffer (10 mM Tris, pH 7,5).

Nach Auftragen der Proben wurde mit einem linearen NaCl-Gradienten eluiert; von: 0,01M TRIS, pH 7,5 nach: 0,01M TRIS + 1M NaCl, pH 7,5. Das Elutionsgemisch wurde mit einer Rollpumpe gefördert. Durchfluß: 3,2 ml/h. Chromatographiedauer: 6 Stunden.

Die Analyse des Eluats erfolgte kontinuierlich mit einer von KADENBACH [58] angegebenen Anordnung:

Das Eluat durchläuft eine Quarzdurchflußküvette im Zeiss-PMQ-2Spektralphotometer, mit dem bei 280m μ die Proteinabsorption gemessen und laufend auf einem Schreiber registriert wird. Nach der Proteinregistrierung wird der Strom des Eluats von einer Sekundärpumpe angezapft, die kontinuierlich etwas Eluat abnimmt und mit einem gleichen Volumen Testgemisch vermischt. (Da synchron CK, AdK und ATPase gemessen wurden, wurde eine 3-fache Anzapfung des Eluats angelegt.). Die Mischung von Eluat und Testgemisch durchströmt langsam eine Inkubationsstrecke mit Thermostatierung von 25°C. Anschließend wird im Photometer "Eppendorf" mit Hilfe der Küvettenwechselautomatik in Durchflußküvetten bei 366m μ die Aktivität der CK, AdK und ATPase und die Leerextinktion des Eluats fortlaufend gemessen und auf einem Philips-Linienschreiber registriert.

7. Analyse der Creatinphosphatbildung.

Isolierte Mitochondrien wurden in O₂-gesättigtes, isotonisches Saccharosemedium gebracht. Als zu veratmendes Substrat wurden Succinat, Ketoglutarat oder Hydroxybutyrat zugefügt. Je nach Versuchsanordnung wurden Phosphat, Magnesium, Creatin und ADP zugesetzt. Die Mitochondrien wurden für 1-5 min. unter O₂-Überströmung und leichtem Rühren in diesem Medium bei 20°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Enteiweißen (3M HClO₄ ad 0,5M) gestoppt. Danach war rasches Aufarbeiten unter Kühlung nötig: Abzentrifugieren, Wägen des Überstandes und Neutralisieren mit 3N KOH. Der Nachweis des gebildeten Cr-P erfolgte bei Verwendung von P³²-markiertem anorganischem Phosphat durch Anionenaustauschchromatographie, in den übrigen Versuchen durch enzymatische Analyse.

a. Nachweis von Cr-P durch Ionenaustauschchromatographie.

Die Technik ist von HELDT [45] näher beschrieben worden. Sie kann hier nur kurz erwähnt werden. Es handelt sich um eine Nano-Mol- (10^{-9} Mol)-Analysestechnik an Dowex 2x10 Austauscher. Der Austauscher ist in feinen Polyäthylenschläuchen von 1,1mm Innendurchmesser und einer Länge von 100-200cm untergebracht. Nach Formiatbeladung und Freiwaschen von überschüssiger Säure wird der neutralisierte Extrakt aufgebracht. Die Elution erfolgt mit einem linearen Ameisensäure/Ammoniumformiatgradienten.

Die Analyse des Eluats erfolgte weitgehend automatisiert. Mit einem speziell adaptierten Photometer "Eppendorf" wurde in einer Durchflußzelle fortlaufend die Extinktion bei 265m μ (Nukleotide) gemessen und auf einem Philips-12-Punkte-Drucker registriert. Am nicht unterbrochenen Strom des Eluats wurde danach die Radioaktivität des P^{32} mit einer nach HELDT [44] für die Radiochromatographie umgebauten Methandurchflußsonde und einem Philips-Meßplatz gezählt und registriert. Abschließend wurde das Eluat im Mikrofraktionssammler nach SCHNITGER [104] aufgeteilt und auf Gesamtphosphat analysiert. In der gezeigten Abb. 8 erfolgte die Extinktionsmessung des gebildeten Phosphormolybdatblaukomplexes in einer von HELDT [unveröff.] entwickelten halbautomatischen Technik.

b. Nachweis von Cr-P durch enzymatische Analyse.

Creatinphosphat wurde nach dem Prinzip von TANZER u. GILVARG [110] im optisch-enzymatischen Test nach der Vorschrift von HOHORST [51] bestimmt. In diesem mit Creatinkinase, Hexokinase und Glucose-6-phosphatdehydrogenase laufenden, gekoppelten Test wird 1Mol TPN pro 1Mol Cr-P hydriert. An den Extrakten kann gleichzeitig ATP getestet werden.

Zusammensetzung des Tests auf Creatinphosphat nach HOHORST [51]

Tra-Puffer	100mM	Vol. = 1ml
EDTA	1mM	
MgCl ₂	3mM	pH = 7,6
TPN	1mM	
G-6-PDH	0,7i.U./ml	
Glucose	1mM	
HK	1,4i.U./ml	
ADP	0,5mM	
CK	7,2i.U./ml	Start mit Enzym

8. Direktregistrierung der Phosphatenergieübertragung mit dem Doppelstrahlphotometer.

Messungen der Creatinkinase-reaktion sind mit zwei prinzipiell verschiedenen Methoden möglich: Analyse von Einzelproben (wie unter 7. soeben beschrieben) oder durch eine direkte Registrierung ohne Probenentnahme. Die Direktregistrierung hat den Vorteil einer guten zeitlichen Auflösung und z.T. auch den einer gesteigerten Empfindlichkeit. Für das Studium der Energieübertragung aus äußerem Cr-P auf die oxidative Phosphorylierung und die Atmungskette der Mitochondrien wurde eine optische Registrierung des Redoxzustandes bestimmter Atmungsenzyme durchgeführt. Als Messgerät diente die Marburger Modifikation des Doppelstrahlspektrophotometers nach CHANCE [c.f. 61]. Das Gerät gestattet an Mitochondriensuspensionen - Medien hoher Trübung und Streuung - durch Verwendung von zwei geeignet gewählten, unabhängigen Wellenlängen, die die Suspension mit 50Hz alternierend durchstrahlen und die durch elektronische Demodulation als Mess- und Vergleichsstrahlung dienen, nahezu wie an klaren Lösungen zu messen.

Die Energieübertragungsreaktion wurde nach dem Prinzip von KLINGENBERG u. SCHOLLMAYER [64,65] studiert: In der terminalen Atmung gehemmte Mitochondrien zeigen reduzierte Cytochrome. Gelingt es in Gegenwart eines Wasserstoffakzeptors durch Zufügen einer energiereichen Verbindung eine Oxidation der Cytochrome zu erreichen, darf auf Energieübertragung über die Systeme der oxidativen Phosphorylierung und des Elektronentransports geschlossen werden.

Diskussion

1. Vorkommen von Creatinkinase in Mitochondrien.

Das von MEYERHOF und LOHMANN [80] entdeckte Enzym wurde später von KUBY [66] aus Kaninchenmuskel in kristalliner Form dargestellt. Das so gereinigte Enzym erweist sich in der Elektrophorese als reines Isoenzym c_3 . Die Tatsache, daß die mitochondriale Form der Creatinkinase erst 30 Jahre nach der cytoplasmatischen Form gefunden wurde, bedarf einer Erklärung.

Bisher beschäftigte sich die Creatinkinase-Forschung überwiegend mit dem Enzym aus Kaninchenmuskel. Wie KUBY [66] gezeigt hat, ist dieses Isoenzym besonders stabil gegen Aethanol. Unsere Befunde (V,2) an m-CK aus Rinderherz zeigen, daß das m-Isoenzym eine wesentlich geringere Aethanolstabilität besitzt. Die Aethanol-Fraktionierungsmethode nach KUBY bewirkt, daß eventuell mitextrahiertes mitochondriales Enzym inaktiviert ist. Auch die Extraktionsmethode von KUBY und die relative Mitochondrienarmut des verwendeten Kaninchenmuskels können bedingt haben, daß die Existenz einer m-CK nicht wenigstens als "Aktivitätsverlust" im Reinigungsgang bemerkt wurde.

Bei Verwendung mitochondrienreicher Organe wie Herz und Hirn oder beim Studium isolierter Mitochondrien konnte das Enzym aber nicht übersehen werden. So hat BURGER [13] bei der Beschreibung der Heterogenität der CK bereits in einer Elektrophorese von Rattenherzmuskel das m-Isoenzym der CK abgebildet. Da er aber von der Vorstellung der ausschließlich cytoplasmatischen Lokalisation ausging, ließ er den Befund ohne Interpretation.

WOOD hat bei der Reinigung der CK aus Ochsenhirn die Existenz einer partikelgebundenen CK gefunden [126]. Er konnte zeigen, daß ein großer Teil der partikelgebundenen CK in den Mitochondrien des Hirns lokalisiert

ist. Ein kleiner Teil ist mit der Mikrosomenfraktion des Hirns verbunden. WOOD hat besonders die Funktion dieser mikrosomalen CK studiert. Unsere erste Mitteilung [54] über CK in Mitochondrien aus verschiedenen Muskeln und Hirn und die Mitteilung WOOD's [126] über CK in Mitochondrien und Mikrosomen aus Hirn erfolgten gleichzeitig und unabhängig voneinander. Von zwei von WOOD angegebenen Werten stimmt der Wert von 32% mitochondrialer CK in Meerschweinchenhirn gut mit unserem Wert von 32% m-CK in Rattenhirn überein.

Eine später erschienene Arbeit von KLEINE [60] über die intrazelluläre Verteilung der CK in menschlichem Skelettmuskel steht in Widerspruch zu unseren Befunden. KLEINE betont, daß nur im Cytoplasma, nicht aber in den Mitochondrien, CK vorhanden sei. Dieses Resultat ist bedingt durch experimentelle Fehler: KLEINE verwendet als Extraktionsmittel für die Mitochondrien hypertonsche Saccharoselösungen. Nach unseren Befunden über die Ablösbarkeit tritt dabei die m-CK nicht aus den Mitochondrien aus.

Neben der Lokalisation sprechen eine Reihe von weiteren Kriterien für die Existenz einer m-CK.

2. Konstante Relation der m-CK-Aktivität zum Cytochromgehalt.

Die gefundene konstante Relation der m-CK zur proportionskonstanten Gruppe der Enzyme der Atmungskette und des Citratzyklus [98] wurde bereits als Argument gegen den Verdacht angeführt (I,2), CK in Mitochondrien sei möglicherweise nur eine cytoplasmatische Verunreinigung: Zufällige Verunreinigung muß eine Zufallsverteilung der gemessenen Aktivitäten ergeben. Die konstante Relation deutet aber im Gegensatz dazu auf eine streng regelmäßige Verteilung der CK.

Der Begriff der "Proportionskonstanz" kann nicht angewendet werden, da hierfür Vorkommen der konstanten Beziehung in allen Geweben eines Organismus und bei den

verschiedensten Organismen zu fordern ist. m-CK kommt aber bei der Ratte z.B. nur in Muskeln und Hirn vor, dagegen nicht in Leber und Niere. Das Vorkommen der CK im Tierreich ist begrenzt; die überwiegende Zahl der Species hat andere ATP-Guanidino-Phosphotransferasen [c.f.36].

Die Verallgemeinerung ist zu beschränken: m-CK wird in konstanter Relation nur in den Geweben gefunden, in denen Creatin phosphoryliert wird.

Die Theorie von den "proportionskonstanten Enzymgruppen" [9,10] erlaubt Schlüsse über die funktionelle Bedeutung eines Enzyms. Proportionskonstanz wurde bisher nur an Haupt- und Schaltstücken der Stoffwechselwege gefunden. Wenn die Analogie zulässig ist, muß auch die m-CK Teil eines solchen - noch unbekannten - Hauptwegs des mitochondrialen Phosphatstoffwechsels sein. Auch die vergleichsweise hohe Aktivität des Enzyms in den Mitochondrien spricht für diese Vermutung.

Funktionelle Annahmen über Zusammenhänge zwischen Cytochrom c und m-CK haben sich nicht bestätigt: Ein aktiver Cytochrom c-m-CK-Komplex existiert nicht (V,4). Die Energieübertragung aus Cr-P auf die Atmungskette intakter Mitochondrien ist nicht auf den Cytochrom-Bereich beschränkt (IV,2).

3. Ablösbare mitochondriale Enzyme.

Bisher wurden die mitochondrialen Enzyme in zwei Gruppen geteilt: Strukturgebundene, unlösliche Enzyme (Pyruvatoxidase, Ketoglutaratoxidase, Succinatdehydrogenase, Cytochrom b und a, u.a.) und lösliche Enzyme (DPN- und TPN-spezifische Isocitratdehydrogenasen, Malatdehydrogenase, u.a.). Lösliche Enzyme gehen erst nach mechanischer Desintegration der Mitochondrien in salinischen Extraktionsmitteln von neutralem pH in Lösung. Strukturgebundene Enzyme bleiben bei dieser Extraktionsmethode unlöslich.

Die mitochondriale CK läßt sich keiner der beiden Gruppen zuordnen. Es gibt weitere mitochondriale Enzyme, die sich ähnlich verhalten: Von dem mitochondrialen Atmungspigment Cytochrom c ist seit langem bekannt [c.f.105], daß es bereits ohne mechanische Desintegration aus den Mitochondrien austritt. Von LEHNINGER [74] wurde kürzlich berichtet, daß das mitochondriale ADP-ATP-Austauschenzym sich durch besonders leichtes Auslaufen ("leakage") aus Mitochondrien auszeichne. Die in Abb.2 gezeigte Ablösbarkeit der m-CK stellt einen ähnlichen Fall dar. Neuere Untersuchungen von SCHWALBACH [10()] haben ergeben, daß auch die mitochondriale Adenylatkinase durch leichte Ablösbarkeit charakterisiert ist. Die m-CK scheint demnach einer Gruppe von Enzymen anzugehören, für die der Name "ablösbare mitochondriale Enzyme" vorgeschlagen wird.

Die Begriffe "leicht gebunden" und "fest gebunden" erscheinen weniger geeignet zur Charakterisierung dieser Enzyme. Während m-CK aus Rattenherz sehr leicht ablösbar ist, scheint die m-CK aus Rattenhirn fester gebunden zu sein. Gemeinsam ist aber beiden Enzymen die Ablösbarkeit. Die Frage der Bindung und Löslichkeit mitochondrialer Enzyme bedarf weiterer Erforschung. Die in neuester Zeit mitgeteilten Ergebnisse über die Lösungsmachung "unlöslicher" mitochondrialer Enzyme, wie der Succinatdehydrogenase und des Cytochrom a, durch bloße pH-Erhöhung [107,59,97] zeigen, daß ältere Anschauungen einer neuen Fassung bedürfen.

4. Verhalten der m-CK als Isoenzym.

Der Nachweis der Isoenzymnatur und das im Vergleich zu den cytoplasmatischen Isoenzymen unterschiedliche Verhalten werden als der eigentliche Beweis für die Existenz einer mitochondrialen Form der Creatinkinase angesehen.

Für die c-CK ist von BURGER [12,13], SJÖVALL u. VOIGT [108] und [55] und DEUL [30] gute Wanderungsfähigkeit in der

Agargel-Elektrophorese als typisch beschrieben worden. Dagegen ist die geringe Wanderungsfähigkeit der m-CK auffällig. Auch mit der verbesserten Technik der Elektrophorese auf Agarosegel wird dieses Verhalten beobachtet. Die Wanderungsfähigkeit ist hierbei zwar verbessert, so daß eine Mikroheterogenität zwischen der m-CK von Hirn und Herz der Ratte beobachtet werden kann, aber im Vergleich zur elektrophoretischen Mobilität der schnellsten c-CK-Bande (c_1), ist sie doch sehr gering.

Für andere Enzyme, die mitochondriale und cytoplasmatische Isoenzyme besitzen, wurde bereits die geringe elektrophoretische Mobilität des mitochondrialen Isoenzyms bei pH-Werten um 8 beschrieben. Dieser Befund war gleichartig trotz verschiedenartiger Elektrophorestechniken der einzelnen Untersucher. WIELAND et al. [121] beschrieben geringe elektrophoretische Mobilität der m-MDH bei Elektrophorese auf Cellulose-Acetat-Folie. Für m-GOT zeigte BOYD [6] das Zurückbleiben der mitochondrialen Form am Start der Hochspannungselektrophorese auf Papier.

TSAO [118] beschrieb eine am Start der Stärkegel-Elektrophorese zurückbleibende Fraktion der T-IDH. Aus den Angaben von BELL und BARON [3] geht das elektrophoretische Verhalten der m-T-IDH nicht ganz klar hervor (die Autoren scheinen mit cytoplasmatisch kontaminierten Mitochondrienextrakten gearbeitet zu haben). Bei einer Nachprüfung mit der Agargeltechnik von BURGER [13] fanden wir: m-T-IDH von Niere und Leber der Ratte wird nur gering anodisch vom Start verschoben, die cytoplasmatischen Enzyme (c-T-IDH) von Leber und Niere wandern stark anodisch und sind voneinander verschieden.

Die geringe elektrophoretische Mobilität scheint allen mitochondrialen Isoenzymen gemeinsam zu sein; die m-CK folgt dieser Regel.

Auch bei der chromatographischen Isoenzymtrennung wurden Gemeinsamkeiten der mitochondrialen Enzymproteine entdeckt. THORNE [115,116] zeigte, daß m-MDH in Anionenaustauschchromatographie an Amberlite als "kationisches

Protein" im Vorlauf erscheint. BOYD [6] und BORST und PEETERS [5] beschrieben, daß m-GOT in der Anionenaustauschchromatographie sich ebenfalls als kationisches Protein verhält. Wir haben gezeigt (III,2), daß m-CK nicht an TEAE-Cellulose gebunden wird, während die c-Isoenzyme der CK sich an diesem Anionenaustauscher chromatographieren lassen. m-CK ist mithin auch ein kationisches Protein und verhält sich in dieser Hinsicht wie die mitochondrialen Isoenzyme von MDH und GOT.

Für cytoplasmatische Isoenzyme - z.B. LDH - sind Unterschiede der kinetischen Konstanten schwer zu zeigen [120]. Zwischen mitochondrialen und cytoplasmatischen Enzymen bestehen dagegen deutliche Unterschiede. Verschiedene Michaeliskonstanten für die MDH-Formen zeigten z.B. BÜCHER und KLINGENBERG [8] und für GOT MORINO et al. [84]. Es liegt daher nahe, solche Unterschiede auch für die c- und m-Isoenzyme der CK zu vermuten. Zur Klärung dieser Annahme ist die vergleichende Untersuchung reiner Isoenzyme nötig: c_1 wurde von WOOD [124,125] dargestellt, c_3 ist das nach KUBY [66] kristallisierte Isoenzym. Die Reinigung des m-Isoenzyms wird in dieser Arbeit beschrieben. Die Bestimmung der kinetischen Daten der m-CK und der Vergleich mit den cytoplasmatischen Isoenzymen ist auch für die funktionelle Deutung sehr wichtig. Die zellphysiologisch unterschiedliche Rolle der cytoplasmatischen und mitochondrialen Creatinkinasen könnte sich in der Verschiedenheit kinetischer Eigenschaften widerspiegeln.

5. Zur biochemischen Funktion des Enzyms.

m-CK unterscheidet sich in der katalysierten Reaktion nicht von den cytoplasmatischen Isoenzymen. Das Enzym folgt damit der Definition der Isoenzyme. Die Studien an intakten Mitochondrien zeigen, daß das Enzym in reversibler Reaktion eine energiereiche Phosphatgruppe zwischen ATP und Creatin überträgt. Intramitochondrial gebildetes ATP kann seine endständige Phosphatgruppe auf extramitochondriales Creatin übertragen. Extramitochon-

driales Cr-P kann seine energiereiche Phosphatgruppe in das System der oxidativen Phosphorylierung einschleusen.

Auffällig ist die Rolle von exogenem ADP und exogenem Magnesium. Beide sind in bestimmten kleinen Konzentrationen erforderlich, um eine optimale Aktivität der CK in den Mitochondrien zu bewirken. Die Bedürftigkeit für exogene Adeninnukleotide und die Befunde über die leichte Ablösbarkeit der m-CK führen zu den Annahme, daß das Enzym im äußeren Bereich des Mitochondriums lokalisiert sein muß, sei es in der Außenmembran oder im intracristalen Raum. Das Enzym kann nicht mit den endogenen, gebundenen Adeninnukleotiden reagieren, von denen erst kürzlich HELDT et al. [47] gezeigt haben, daß sie frühe Akzeptoren des energiereichen Phosphats der oxidativen Phosphorylierung sind. Die endogenen Adeninnukleotide werden im Matrixraum der Mitochondrien vermutet. Endogenes ATP und Creatinkinase, beide an bestimmte Bindungsplätze fixiert, wären dann räumlich voneinander getrennt. Zwischen ihnen scheinen exogenes Adeninnukleotid und Magnesium, die frei in den intracristalen Raum permeieren können müßten, eine Übertragungsfunktion auszuüben. Die Ausschleusung energiereichen Phosphats erfolgt in Muskel und Hirn also nicht über den Hauptweg des ATP, sondern auch über den Nebenweg der Phosphorylierung des Creatins.

6. Physiologische und zellphysiologische Bedeutung des Enzyms.

Zu dieser Frage liegen keine Messungen vor. Es kann nur versucht werden, das neue Enzym einzuordnen in das Bild, das die neuere Physiologie von der Mechanochemie der Muskelkontraktion gibt. Die Rolle des Creatinphosphats bei der Kontraktion ist in neueren Untersuchungen von DAVIES [26], HOHORST [50] u. CARLSON [16,17] betont worden. FLECKENSTEIN [39] u. MOMMAERTS [82] haben ihre früheren Auffassungen revidiert. DAVIES [26] hat eine ausführliche Theorie des Kontraktionsvorganges entwickelt: Knüpfung und Lösung von H-Meromyosin-brücken an ADP-Actin sollen unter Energieverbrauch eine Mikrokontraktion bewirken, aus der die sichtbare Kontraktion der Muskelfaser resultiert. Die abgespaltene endständige Gruppe energiereichen Phosphats aus H-Meromyosin-

gebundenem ATP soll durch Phosphorylierung aus den Cr-P Reserven sofort wieder aufgefüllt werden. Hier scheint die von YAGI [127] postulierte Myosin-gebundene-CK wirksam zu sein.

HOHORST [50] hat gezeigt, daß im Skelettmuskel das Creatinphosphat/Creatin-System nicht im Gleichgewicht steht mit dem ATP/ADP-System. Trotz hoher Aktivität der cytoplasmatischen CK fällt bei Kontraktion nur der Cr-P-Spiegel rasch, während ATP nur ganz gering nachfolgt. HOHORST schließt daraus, daß nur ein kleiner Prozentsatz des ATP/ADP-Systems mit dem Cr-P/Cr-System im Gleichgewicht steht. HOHORST fordert eine Kompartimentierung des Adeninnukleotids in ein aktives "turnover-Adeninnukleotid" und ein storage-Adeninnukleotid".

Schwierig ist die Deutung der Beteiligung der Adeninnukleotide an der ^{zu}Verknüpfung von Kontraktionsleistung und Zellatmung. Im Ruhestand zeigt der Muskel eine kleine Atmung, die "Ruheatmung". Die Muskelatmung kann im Gefolge der Kontraktion bis auf das 7-fache gesteigert werden [48]. CHANCE [18] hat versucht, dies durch einen einfachen Kreislauf des Adeninnukleotids zu klären: ATP wird bei der Kontraktion zu ADP dephosphoryliert und gelangt zu den Mitochondrien des Muskels. Hier löst das ADP durch den Atmungskontrollmechanismus eine Atmungssteigerung aus. Durch oxidative Phosphorylierung wird das ADP zu ATP rephosphoryliert und kann wieder in der Kontraktion wirksam werden. Diese Hypothese wird abgeleitet aus Modellversuchen an isolierten Mitochondrien. CHANCE hat aber selbst darauf hingewiesen [20], daß dieser Vorstellung zur Zeit ernste Widersprüche im Wege stehen. Das "Ruhe-ADP" des Muskels, das von verschiedenen Autoren bestimmt wurde, ist so hoch, daß es bereits halbmaximale Atmung der Mitochondrien auslösen müßte. Da dieses das Gesamt-ADP des ruhenden Muskels ist, kann auch hier nur die Annahme einer Kompartimentierung in aktives und inaktives ADP vermutet werden. Andererseits hat CHANCE [20] bemerkt, daß die beobachteten Änderungen des ATP/ADP-Spiegels bei der Kontraktion so klein sind, daß sie nur eine geringe Atmungssteigerung, nicht aber eine Steigerung um mehrere 100% bewirken können. CHANCE [18] hat bei

seinen Versuchen zur Muskelatmung die Annahme gemacht, nur Adeninnukleotid oder Phosphat könnten die Kopplung zwischen Energieverbrauch in der Kontraktion und Steigerung der Atmung bewirken. Die vorgelegten Untersuchungen lassen vermuten, daß der Creatinphosphat/Creatin-Spiegel auch eine solche Kopplung bilden kann: Freies Creatin wird von den Mitochondrien in Gegenwart von einer geringen Konzentration von ADP durch oxidative Phosphorylierung phosphoryliert(IV,1). Hohe Konzentrationen an Cr-P außerhalb der Mitochondrien wirken andererseits auf die oxidative Phosphorylierung zurück und dämpfen die Atmung (IV,2). Die Ergebnisse von HOHORST [50] machen deutlich, daß der Cr-P/Cr-Quotient die raschen und großen Änderungen zeigt, die CHANCE für das Kontraktion und Atmung verknüpfende System gefordert hat, während das Gesamt-ATP/ADP-System nur sehr träge reagiert.

Zellphysiologisch scheint die mitochondriale Creatinkinase eingeschaltet in das System intrazellulärer Metabolitkompartimentierungen. So ist z.B. im Muskel das Adeninnukleotid zu einem Teil fest gebunden als endogenes Adeninnukleotid der Mitochondrien [47], als Actin- und Myosin-gebundenes Adeninnukleotid der Myofibrillen [109] und als endogenes Adeninnukleotid der Mikrosomen des sarcoplasmatischen Reticulums [83]. Dem gebundenen steht das frei diffundierende und permeierende Adeninnukleotid gegenüber. Daten über den prozentualen Anteil der gebundenen und der frei beweglichen Adeninnukleotide am Gesamtgehalt in der Muskelzelle sind bis jetzt nicht erhältlich.

Die Angaben von HOHORST [50] lassen vermuten, daß das frei bewegliche Adeninnukleotid den kleinen Prozentsatz des "turnover-Adeninnukleotids" ausmacht. Mit ihm steht, wie HOHORST gezeigt hat, über die c-CK das Reserve-Cr-P im Gleichgewicht.

Die Zellstrukturen, die gebundenes Adeninnukleotid besitzen, haben auch eigene gebundene Creatinkinasen. In dieser Arbeit ist gezeigt worden, daß die Mitochondrien ein eigenes Isoenzym der CK besitzen. Für Myofibrillen-CK und Muskelmikrosomen-CK ist dieser Nachweis noch nicht erbracht

worden. Den gebundenen Creatinkinasen scheint gemeinsam, daß sie nicht direkt mit dem gebundenen Adeninnukleotid ihrer Strukturen reagieren können. Dies wurde für Muskel-mitochondrien von uns (IV,1 und 2), für Myofibrillenmyosin von YAGI [127] und für Hirnmikrosomen von WOOD [126] gezeigt. Eindrucksvoll ist der Befund von YAGI [127], der fand, daß gebundene CK die Michaeliskonstante des Myosins für ATP um zwei Größenordnungen herabsetzt, die Substrataffinität also beträchtlich erhöht. Die verschiedenen Formen der CK dürften an der räumlichen und funktionellen Orientierung des Stoffwechsels der energiereichen Phosphate in der Muskelzelle erheblichen Anteil haben.

7. Folgerungen für die klinische Enzymdiagnostik.

Der Nachweis von Creatinkinase im Serum hat in der Diagnostik des Herzinfarkts [32] und beim Nachweis von Systemerkrankungen der Skelettmuskulatur [34,33] in den letzten Jahren zunehmend Bedeutung erlangt. Die klinische Forschung hat hier inzwischen eine kaum zu übersehende Fülle von Publikationen hervorgebracht.

Die Auffindung organspezifischer, cytoplasmatischer Isoenzyme der CK [13,55] ist sicherlich wertvoll für die Diagnostik. Bei Serum-CK-Erhöhung fraglicher oder unklarer Genese kann die Isoenzymtrennung über die Organherkunft der CK entscheiden. Die in dieser Arbeit gegebene Differenzierung in cytoplasmatische und mitochondriale Isoenzyme ermöglicht die Klärung der Frage, ob im Serum auftretende CK vorwiegend dem Cytoplasma bestimmter Zellen oder ihren Mitochondrien entstammt. Damit kann ein Einblick in die Art der Zellschädigung gewonnen werden.

In der klinisch-chemischen Literatur [52,96] ist zuerst auf das Vorkommen einer Cystein-aktivierbaren Form der CK im Serum hingewiesen worden. In dieser Arbeit wird gezeigt, daß die mitochondriale Creatinkinase sehr empfindliche SH-Gruppen hat und daß ihre Reaktivierbarkeit durch SH-Gruppen-Donatoren charakteristisch ist. Der Zusammenhang zwischen

Cystein-aktivierbarer Serum-CK und mitochondrialer CK bedarf weiterer Klärung.

Auch die Unterschiede der Aethanolstabilität könnten für die Diagnostik bedeutsam sein: Mitochondriale CK wird durch Aethanolkonzentration^{en} über 40% völlig inaktiviert. Das cytoplasmatische Isoenzym des Muskels zeichnet sich dagegen durch hohe Aethanol-Stabilität aus. Nach KUBY [66] ist dieses Isoenzym oberhalb von 60% Aethanol noch gut stabil. Eventuell läßt sich hieraus eine sehr einfache diagnostische Differenzierung zwischen den Isoenzymen entwickeln.

Eine weitere einfache Trennmöglichkeit für die mitochondrialen und cytoplasmatischen Formen der CK ist durch die unterschiedliche Bindung an Anionenaustauscher gegeben, wie in dieser Arbeit gezeigt wird.

Zusammenfassung

1. Es wird gezeigt, daß es neben der bisher bekannten cytoplasmatischen Form der Creatinkinase eine mitochondriale Form dieses Enzyms gibt.
2. Das Enzym findet sich in hoher Aktivität in Mitochondrien aus Muskel und Hirn; in Leber und Niere kann es dagegen nicht nachgewiesen werden.
3. Die Aktivität des Enzyms geht dem Cytochromgehalt der Organe parallel.
4. Der Anteil des mitochondrialen Enzyms an der Gesamtaktivität der Creatinkinase ist z.T. beträchtlich, so beträgt er in Rattenhirn 32% und in Rattenherz 48%.
5. Das Enzym zeichnet sich durch leichte Ablösbarkeit von der mitochondrialen Struktur aus. Es wird gezeigt, daß es in der Außenmembran oder in den intracristalen Räumen der Mitochondrien lokalisiert sein muß.
6. Mit elektrophoretischen und chromatographischen Techniken wird die Isoenzymnatur der mitochondrialen Creatinkinase nachgewiesen. Das Enzym verhält sich dabei typisch wie andere mitochondriale Isoenzyme.
7. Ein Reinigungsgang für das neue Enzym wird angegeben: Das Enzym konnte aus Rinderherz 160-fach gereinigt werden. Spezifische Aktivität: 331 U./mg Prot.
8. In Versuchen mit isolierten Muskelmitochondrien wird gezeigt, daß diese unter geeigneten Bedingungen zu einer starken Creatinphosphatbildung fähig sind. Auch die Rückübertragung energiereichen Phosphats aus Creatinphosphat auf das System der oxidativen Phosphorylierung ist nachgewiesen worden.
9. Die mögliche physiologische Bedeutung des Enzyms wird diskutiert. Die mitochondriale Creatinkinase muß beteiligt sein an den Prozessen der Dephosphorylierung

und Rephosphorylierung bei Arbeit und Ruhe von Muskel und Hirn. Mitochondriale Creatinkinase erscheint als ein Konstruktionselement in den intrazellulären Kompartimentierungen des energiereichen Phosphats. Auch in der Kopplung zwischen Energieverbrauch und Atmung scheint das Enzym mitzuwirken.

10. Ansatzpunkte für die klinische Enzymdiagnostik werden in der Diskussion aufgezeigt.

Verzeichnis der Abkürzungen.

Adk	= Adenylatkinase
ADP	= Adenosindiphosphat
ATP	= Adenosintriphosphat
c-	= cytoplasmatisch
CK	= Creatinkinase
Cr	= Creatin
Cr-P	= Creatinphosphat
Cyt.	= Cytochrom
EDTA	= Aethylendiamintetraacetat
DEAE-	= Diaethylaminoethyl-
DNP	= 2,4-Dinitrophenol
DPN	= Diphosphopyridinnukleotid (oxidiert)
DPNH	= reduziertes Diphosphopyridinnukleotid
GSH	= reduziertes Glutathion
GOT	= Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
IDH	= Isocitratdehydrogenase
α -KG	= α -Ketoglutarat
LDH	= Lactatdehydrogenase
m-	= mitochondrial
MDH	= Malatdehydrogenase
OxAc	= Oxalacetat
PEP	= Phosphoenolpyruvat
PK	= Pyruvatkinase
Succ	= Succinat
TEA (Tra)	= Triäthanolamin
TEAE-	= Triäethylaminoethyl-
TPN	= Triphosphopyridinnukleotid (oxidiert)
TPNH	= reduziertes Triphosphopyridinnukleotid

Literatur

1. Askonas, B.A.,
"The use of organic solvents at low temperature
for the separation of enzymes. Application to
aqueous rabbit muscle extract."
Biochem.J. 48, 42 (1951).
2. Beisenherz, G., H.J. Boltze, Th. Bücher, R. Czok, K.H.
Garbade, E. Meyer-Arendt und G. Pfeleiderer,
"Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-
Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycero-
phosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus
Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang."
Z.Naturforschung 8b, 555 (1953).
3. Bell, J.L. und D.N. Baron,
"Isoenzymes of isocitric dehydrogenase."
Biochem.J. 82, 5P (1962).
4. Fa. Boehringer und Soehne, Mannheim
"Biochemica Preisliste Nr.8", (1963).
5. Borst, P. und E.M. Peeters,
"The intracellular localization of glutamate-
oxaloacetate transaminases in heart."
Biochim.Biophys.Acta 54, 188 (1961).
6. Boyd, J.W.,
"The intracellular distribution, latency and
electrophoretic mobility of L-glutamate-oxalo-
acetate transaminase from rat liver."
Biochem.J. 81, 434 (1961).
7. Brosemer, R.W., W. Vogell und Th. Bücher,
"Morphologische und enzymatische Muster bei der
Entwicklung indirekter Flugmuskel von Locusta
migratoria."
Biochem.Z. 338, 854 (1963).
8. Bücher, Th. und M. Klingenberg,
"Wege des Wasserstoffs in der lebendigen Organi-
sation."
Angew.Chem. 70, 552 (1958).
9. Bücher, Th.,
"Analogie e particolarita nella ripartizione
de enzimi delle vie-chiave del metabolismo
dei tessuti animali."
Boll.Soc.Ital.Biol.Sper. 36, 1509 (1960).
10. Bücher, Th. und D.Pette,
"Comparable and specific relations in the patterns
of enzymic activities of the main pathways of
energy-producing metabolism."
Proc.V.th Int.Congr.Bioch.Moscow, III, 271 (1961).

11. Bücher, Th., W. Luh und D. Pette,
 "Einfache und zusammengesetzte optische
 Tests mit Pyridinnukleotiden."
 Hoppe-Seyler/Thierfelder, Hdb.d.physiol.
 u.pathol.-chem.Analyse, 10.Aufl., Vol.VI-A, p.319
 (1964).
12. Burger, A., M. Eppenberger, O. Wiesmann und R. Richterich,
 "Isoenzyme der Creatinkinase."
 Helvet.Physiol.et Pharmacol.Acta 21, C6 (1963).
13. Burger, A., R. Richterich und H. Aebi,
 "Die Heterogenität der Kreatin-Kinase."
 Biochem.Z. 339, 305 (1964).
14. Cain, D.F., A.A. Infante und R.E. Davies,
 "Adenosine triphosphate and phosphorylcreatine
 as energy supplies for single contractions of
 working muscle."
 Nature 196, 214 (1962).
15. Cain, D.F. und R.E. Davies,
 "Breakdown of ATP during a single contraction
 of working muscle."
 Biochem.Biophys.Res.Comm. 8, 361 (1962).
16. Carlson, F. und A. Siger,
 "The mechanochemistry of muscular contraction.
 I. The isometric twitch."
 J.Gen.Physiol. 44, 33 (1961).
17. Carlson, F., D.J. Hardy und DR. Wilkie,
 "Total energy production and phosphocreatine
 hydrolysis in the isotonic twitch."
 J.Gen.Physiol. 46, 851 (1963).
18. Chance, Br.,
 "The response of mitochondria to muscular
 contraction."
 Ann.N.Y.Acad.Sci. 81, 477 (1959).
19. Chance, Br. und B. Hagihara,
 "Direct spectroscopic measurements of inter-
 action of components of the respiratory chain
 with ATP, ADP, phosphate and uncoupling agents."
 Proc.V.th Int.Congr.Bioch.Moscow, V, 3 (1961).
20. Chance, Br. und A. Weber,
 "The steady state of cytochrome b during rest
 and after contraction in frog sartorius."
 J.Physiol. (London) 169, 263 (1963).
21. Christie, G.S. und J.D. Judah,
 "Intracellular distribution of enzymes."
 Proc.Roy.Soc.Ser.B., 141, 420 (1953).

22. Cohn, M.,
"Magnetic resonance studies of metal activation of enzymic reactions of nucleotides and other phosphate substrates."
Biochem. 2 632 (1963).
23. Commission on Enzymes,
"Report of the commission on enzymes of the International Union of Biochemistry."
Pergamon Press, Oxford, 1961.
24. Cori, O., A. Traverso-Cori, M. Lagarrigue und F. Marcus,
"Enzymic phosphorylation of creatine by 1:3-Diphosphoglyceric acid."
Biochem.J. 70, 633 (1958).
25. Crane, F.L., J.L. Glenn und D.E. Green,
"Studies on the electron transfer system. IV. The electron transfer particle."
Biochim.Biophys.Acta 22, 475 (1956).
26. Davies, R.E.,
"A molecular theory of muscle contraction: Calcium dependent contractions with hydrogen bond formation plus ATP-dependent extensions of part of the myosin-acting cross bridges."
Nature 199, 1068 (1963).
27. Delbrück, A., E. Zebe und Th. Bücher,
"Über Verteilungsmuster von Enzymen des Energie liefernden Stoffwechsels im Flugmuskel, Sprungmuskel und Fettkörper von Locusta migratoria und ihre cytologische Zuordnung."
Biochem.Z. 331, 273 (1959).
28. Delbrück, A., H. Schimassek, K. Bartsch und Th. Bücher,
"Enzymverteilungsmuster in einigen Organen und in experimentellen Tumoren der Ratte und der Maus."
Biochem.Z. 331, 297 (1959).
29. Delbrück, A.,
unveröffentlicht.
30. Deul, D.H. und J.F.L. van Breemen,
"Electrophoresis of creatine phosphokinase from various organs."
Clin.Chim.Acta 10, 276 (1964).
31. Doherty, M.D. und J.F. Morrison,
"The conversion of adenosine 5'-phosphate into adenosine triphosphate as catalysed by adenosine triphosphate-creatine phosphotransferase and adenosine triphosphate-adenosine monophosphate phosphotransferase in the presence of phospho-creatine."
Biochem.J. 86, 344 (1963).

32. Dreyfus, J.Cl., G. Schapira, J. Renais und L. Scebat,
"La creatine-kinase serique dans le diagnostic
de l'infarctus myocardique."
Rev.franc.Etud.clin.biol. 5, 384 (1960).
33. Dreyfus, J.Cl., G. Schapira und J. Demos,
"Etude de la creatine-kinase serique chez
les myopathes et leurs familles."
Rev.franc.Etud.clin.biol. 5, 384 (1960).
34. Ebashi, S., Y. Togokura, H. Momoi und H. Sugita,
"High creatine phosphokinase activity of sera
of progressive muscular dystrophy."
J.Biochem.(Tokyo) 46, 103 (1959).
35. Ennor, A.H. und H. Rosenberg,
"Some properties of creatine phosphokinase."
Biochem.J. 57, 203 (1954).
36. Ennor, A.H.,
"Guanidine phosphoryltransferases."
in:"Biochemists Handbook"(C.Long, Edit.), p.394
E.and F.Spon Ltd., London, 1961.
37. Eppenberger, H.M., M. Eppenberger, R. Richterich und
H. Aebi,
"The ontogeny of creatine kinase isoenzymes."
Developm.Biol. 10, 1 (1964).
38. Fleckenstein, A., J. Janke, R.E. Davies und H.A. Krebs,
"Chemistry of muscle contraction: Contraction
of muscle without fission of adenosine tri-
phosphate or creatine phosphate."
Nature 174, 1081 (1954).
39. Fleckenstein, A., E. Gerlach, J. Janke und P. Marmier,
"Die Inkorporation vom markiertem Sauerstoff
aus Wasser in ATP-, Kreatinphosphat- und Ortho-
phosphat-Fraktion intakter Muskeln bei Ruhe,
tetanischer Reizung und Erholung."
Pflügers Arch.ges.Physiol. 271, 75 (1960).
40. Friedberg, F.,
"The amino acid composition of ATP-Creatine-
transphosphorylase."
Arch.Biochem.Biophys. 61, 263 (1956).
41. Glaze, R.P. und C.L. Wadkins,
"Kinetic evidence for a complex between ATP-
ADP-exchange enzyme of oxidative phosphorylation
and cytochrome c."
Biochem.Biophys.Res.Comm. 15, 194 (1964).

42. Goebell, H. und M. Klingenberg,
"DPN-spezifische Isocitrat-Dehydrogenase der Mitochondrien.
I. Kinetische Eigenschaften, Vorkommen und Funktion der DPN-spezifischen Isocitrat-Dehydrogenase."
Biochem.Z. 340, 441 (1964).
43. Griffiths, D.E., J.F. Morrison und A.H. Ennor,
"A study of the kinetics of the reactions catalysed by arginine phosphokinase."
Biochem.J. 65, 153 (1957).
44. Heldt, H.W.,
"Über phosphat-haltige Metabolite in Geweben und in isolierten Mitochondrien."
Diss.Phil.Fak., Univ.Marburg (1962).
45. Heldt, H.W.,
"Phosphathaltige Metabolite in Anionenaustausch-chromatogrammen säurelöslicher Extrakte aus Rattenleber in Nano-Bereich."
Biochem.Z. 337, 397 (1963).
46. Heldt, H.W., H. Jacobs und M. Klingenberg,
"Incorporation of P^{32} into mitochondrial compounds."
VI.th Intern.Congr.Biochem., New York 1964
I.U.B., Vol. 32, X-25.
47. Heldt, H.W., H. Jacobs und M. Klingenberg,
"Endogenous ADP of mitochondria, an early phosphate acceptor of oxidative phosphorylation as disclosed by kinetic studies with C^{14} -labelled ADP and ATP and with Atractyloside."
Biochem.Biophys.Res.Comm. 18, 174 (1965).
48. Hill, D.K.,
"The time course of the oxygen consumption of stimulated frog's muscle."
J.Physiol. (London) 98, 207 (1940).
49. Hjerten, St.,
"A new method for preparation of agarose for gel electrophoresis."
Biochim.Biophys.Acta 62, 445 (1962).
50. Hohorst, H.J., M. Reim und H. Bartels,
"Studies on the creatine kinase equilibrium in muscle and the significance of ATP and ADP levels."
Biochem.Biophys.Res.Comm. 7, 142 (1962).
51. Hohorst, H.J.,
persönl. Mitteilung.

52. Hughes, B.P.,
"A method for the estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathological sera."
Clin.Chim.Acta 7, 597 (1962).
53. Infante, A.A. und R.E. Davies,
"ATP-breakdown during a single isotonic twitch of frog sartorius muscle."
Biochem.Biophys.Res.Comm. 9, 410 (1962).
54. Jacobs, H. und H.W. Heldt,
a)"Mitochondriale Creatinkinase."
Referat Nr.49, Gemeins.Tag.d.deutschen,schweizerischen und französischen Biochemiker,
Strasbourg, 1963
b)"Sur la creatine-phosphokinase mitochondriale."
Bull.Soc.Chim.Biol. 46, 188 (1964).
55. Jacobs, H., H.W. Heldt und M. Klingenberg,
"High activity of creatine kinase in mitochondria from muscle and brain and evidence for a separate mitochondrial isoenzyme of creatine kinase."
Biochem.Biophys.Res.Comm. 16, 516 (1964).
56. Jöbsis, F.J.,
"A study of preparative procedures for brain mitochondria."
Biochim.Biophys.Acta 74, 60 (1963).
57. Kadenbach, B.,
"Der Einfluß von Thyreoidhormonen in vivo auf die oxidative Phosphorylierung und Enzymaktivitäten in Mitochondrien."
Diss.Naturwiss.Fak.,Univ. Marburg (1964).
58. Kadenbach, B.,
persönl. Mitteilung.
59. Keilin, D. und Ts.E. King,
"Reconstitution of the succinic oxidase system from soluble succinic dehydrogenase and a particulate cytochrome system preparation."
Nature 181, 1520 (1958).
60. Kleine, T.O.,
"Zur Lokalisation der Creatinkinase (CK) im Skelettmuskel des Menschen."
Clin.Chim.Acta 11, 85 (1965).
61. Klingenberg, M. und Th. Bücher,
"Flugmuskelmitochondrien aus Locusta migratoria mit Atmungskontrolle. Aufbau und Zusammensetzung der Atmungskette."
Biochem.Z. 331, 312 (1959).

62. Klingenberg, M. und P. Schollmeyer,
"Zur Reversibilität der oxidativen Phosphorylierung. ATP-abhängige Atmungskontrolle und Reduktion von Diphosphopyridinnukleotid in Mitochondrien." Biochem.Z. 332, 335 (1960).
63. Klingenberg, M. und P. Schollmeyer,
"Zur Reversibilität der oxidativen Phosphorylierung.
II. Der Einfluß von ATP auf die Atmungskette in atmenden Mitochondrien." Biochem.Z. 335, 231 (1961).
64. Klingenberg, M. und P. Schollmeyer,
"Zur Reversibilität der oxidativen Phosphorylierung.
III. Der Einfluß von ATP auf die Atmungskette in atmungsgehemmten Mitochondrien." Biochem.Z. 335, 243 (1961).
65. Klingenberg, M.,
"Zur Reversibilität der oxidativen Phosphorylierung.
IV. Die Beziehungen zwischen dem Redoxzustand des Cytochrom c und dem Phosphorylierungspotential des Adenosintriphosphates." Biochem.Z. 335, 263 (1961).
66. Kuby, St.A., L. Noda und H.A. Lardy,
"Adenosinetriphosphate-Creatine transphosphorylase. I. Isolation of the crystalline enzyme from rabbit muscle." J.Biol.Chem. 209, 191 (1954).
67. Kuby, St.A., L. Noda und H.A. Lardy,
"Adenosinetriphosphate-creatine transphosphorylase. III. Kinetic studies." J.Biol.Chem. 210, 65 (1954).
68. Kuby, St.A. und T.A. Mahowald,
"ATP-Transphosphorylases." Fed.Proc. 17, 258 (1958).
69. Kuby, St.A. und E.A. Noltmann,
"ATP-Creatine Transphosphorylase." in: "Enzymes" (P.D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck-Editors) Vol. VI, p. 515 - Academic Press, New York, 1962.
70. Kliehmann, K.,
"Entwicklung einer neuen Methodik zur quantitativen Elektrophorese der Serumproteine im Agar-Agar-Gel." Diss. Mediz. Fak., Univ. Marburg (1962).
71. Kröger, A.,
persönl. Mitteilung.

72. Laturaze, J. und P.V. Vignais,
"Isolement d'un complexe enzyme d'echange ADP-ATP-
cytochrome c reduit."
Biochim.Biophys.Acta 92, 184 (1964).
73. Lehmann, H.,
"Über die enzymatische Synthese der Kreatin-
phosphorsäure durch Umesterung der Phosphobrenz-
traubensäure."
Biochem.Z. 281, 271 (1935).
74. Lehninger, A.L.,
"Intermediate enzymatic reactions in the coupling
of phosphorylation to electron transport."
Proc.V.th Intern.Congr.Biochem.Moscow,V, 239 (1961).
75. Lohmann, K.,
"Über die enzymatische Aufspaltung der Kreatin-
phosphorsäure; zugleich ein Beitrag zum Chemismus
der Muskelkontraktion."
Biochem.Z. 271, 264 (1934).
76. Lundsgaard, E.,
"Untersuchungen über Muskelkontraktionen ohne Milch-
säurebildung."
Biochem.Z. 217, 162 (1930a).
77. Lundsgaard, E.,
"Weitere Untersuchungen über Muskelkontraktionen
ohne Milchsäurebildung."
Biochem.Z. 227, 51 (1930b).
78. Lundsgaard, E.,
"Phosphagen- und Pyrophosphatumsatz in jodessig-
säurevergifteten Muskeln."
Biochem.Z. 269, 308 (1934).
79. Markert, C.L. und F. Möller,
"Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic
and species specific patterns."
Proc.Natl.Acad.Sci. 45, 753 (1959).
80. Meyerhof, O. und K. Lohmann,
"Über energetische Wechselbeziehungen zwischen
dem Umsatz der Phosphorsäureester im Muskelextrakt."
Biochem.Z. 253, 431 (1932).
81. Mommaerts, W.F.M.,
"Is adenosine triphosphate broken down during
a single muscle twitch?"
Nature 174, 1083 (1954).

82. Mommaerts, W.F.H.M., K. Seraydarian und A. Wallner,
"Demonstration of phosphocreatine splitting
as an early reaction in contracting frog
sartorius muscle."
Biochim.Biophys.Acta 63, 75 (1962).
83. Molnar, J. und L. Lorand,
"A phosphoryl group acceptor attached to the
microsomal fraction of muscle."
Arch.Biochem.Biophys. 98, 356 (1962).
84. Morino, Y., H. Itoh und H. Wada,
"Crystallization of 2-Oxoglutarate L-aspartate
transaminases from mitochondrial and soluble
fractions from beef liver."
Biochem.Biophys.Res.Comm. 13, 348 (1963).
85. Morino, Y., H. Kagamiyama und H. Wada,
"Immunochemical distinction between glutamic-
oxalacetic transaminases from the soluble and
mitochondrial fractions of mammalian tissues."
J.Biol.Chem. 239, PC 943 (1964).
86. Morrison, J.F., D.E. Griffiths and A.H. Ennor,
"The purification and properties of arginine
phosphokinase."
Biochem.J. 65, 143 (1957).
87. Morrison, J.F. und M.D. Doherty,
"The biosynthesis of N-phosphorylcreatine:
an investigation of the postulated alternative
pathway."
Biochem.J. 79, 433 (1961).
88. Morrison, J.F., W.J.O'Sullivan und A.G. Ogston,
"Kinetic studies of the activation of creatine
phosphoryltransferase by magnesium."
Biochim.Biophys.Acta 52, 82 (1961).
89. Morrison, J.F. und W.J. O'Sullivan,
"Kinetic studies of the reverse reaction catalysed
by ATP-creatine phosphotransferase.
The inhibition by magnesium ions and adenosine
diphosphate."
Biochem.J. 94, 221 (1965).
90. Morton, R.K.,
"Methods of extraction of enzymes from animal
tissues."
in: "Methods of Enzymology" (S.P. Colowick and
N.G. Kaplan-Editors), Academic Press, New York
Vol. I, 25 (1955).
91. Nichol, Ch.J.,
"Serum creatine phosphokinase in mice with
muscular dystrophy."
Enzymol.Biol.Clin. 4, 217 (1964).

92. Noda, I., St.A. Kuby und H.A. Lardy,
"Adenosinetriphosphate-creatine transphosphorylase.
II. Homogeneity and physicochemical properties."
J.Biol.Chem. 209, 203 (1954).
93. Noda, L., St.A. Kuby und H.A. Lardy,
"Adenosinetriphosphate-creatine transphosphorylase.
IV. Equilibrium studies."
J.Biol.Chem. 210, 83 (1954).
94. Noda, L., T. Nihei und M.F. Morales,
"The enzymatic activity and inhibition of ATP-
creatine transphosphorylase."
J.Biol.Chem. 235, 2830 (1960).
95. Noltmann, E.A., Th.A. Mahowald und St.A. Kuby,
"Amino acid composition of ATP-creatine trans-
phosphorylase."
J.Biol.Chem. 237, 1146 (1962).
96. Okinaka, Sh., H. Sugita, H. Momoi, Y. Toyokura, T.
Watanabe, F. Ebashi und S. Ebashi,
"Cysteine-stimulated serum creatine kinase in
health and disease."
J.Lab.Clin.Med. 64, 299 (1964).
97. Person, P. und H. Zipper,
"Disruption of mitochondria and solubilization
of cytochrome oxidase by Na₂EDTA and by TRIS-
buffer at high pH values." ⁴
Biochem.Biophys.Res.Comm. 18, 396 (1965).
98. Pette, D., M. Klingenberg und Th. Bücher,
"Comparable and specific proportions in the
mitochondrial enzyme activity pattern."
Biochem.Biophys.Res.Comm. 7, 425 (1962).
99. Pette, D.,
Diskussionsbemerkung zu 54 a.
100. Pette, D.,
unveröffentlicht.
101. Pradel, L.A., R. Kassab und N. van Thoai,
"Sur l'ATP: guanidoacetatphosphotransferase."
Biochim.Biophys.Acta 81, 86 (1964).
102. Robin, Y.,
"Biological distribution of guanidines and
phosphagenes in marine Annelida and related
phyle from California, with a note on pluri-
phosphagenes."
Comp.Biochem.Physiol. 12, 347 (1964).
103. Rosenberg, H. und A.H. Ennor,
"Studies on creatine phosphokinase."
Biochim.Biophys.Acta 17, 261 (1955).

104. Schnitger, H., K.Papenberg, E. Ganse, R. Czok, Th. Bücher und H. Adam,
"Chromatographie phosphathaltiger Metabolite eines menschlichen Leberpunktats."
Biochem.Z. 332, 167 (1959).
105. Schollmeyer, P. und M. Klingenberg,
"Über den Cytochromgehalt tierischer Gewebe."
Biochem.Z. 335, 426 (1962).
106. Schwalbach, K.,
persönliche Mitteilung.
107. Singer, Th.P., E.B. Kearney und P. Bernath,
"Studies on succinic dehydrogenase.
Isolation and properties of the dehydrogenase from beef heart."
J.Biol.Chem. 223, 599 (1956).
108. Sjövall, K. und A. Voigt,
"Creatine-phosphotransferase isoenzymes."
Nature 202, 701 (1964).
109. Strohman, R.C.,
"Studies on the enzymic interactions of the bound nucleotide of the muscle protein actin."
Biochim.Biophys.Acta 32, 436 (1959).
110. Tanzer, M.L. und Ch. Gilvarg,
"Creatine and creatine kinase measurement."
J.Biol.Chem. 234, 3201 (1959).
111. Thoai, N.v. und L.A. Pradel,
"Taurocyamine phosphokinase. Purification et caractères generaux."
Bull.Soc.Chim.Biol. 44, 641 (1962).
112. Thoai, N.V. und L.A. Pradel,
"Groupements actifs de la taurocyamine phosphokinase."
Bull.Soc.Chim.Biol. 44, 1089 (1962).
113. Thoai, N.v., Y. Robin und L.A. Pradel,
"Hypotaurocyamine phosphokinase. Comparision avec la taurocyamine phosphokinase."
Biochim.Biophys.Acta 73, 437 (1963).
114. Thomson, A.R., J.W. Eveleigh und B.J. Miles,
"Aminoacid sequence around the reactive thiol groups of adenosine triphosphate - creatine phosphotransferase."
Nature 203, 267 (1964).

115. Thorne, C.J.R.,
"Characterisation of two malic dehydrogenases
from rat liver."
Biochim.Biophys.Acta 42, 175 (1960).
116. Thorne, C.J.R.,
"Properties of mitochondrial malate dehydro-
genases."
Biochim.Biophys.Acta 59, 624 (1962).
117. Truman, D.E.S.,
"The fractionation of protein from ox-heart
mitochondria labelled in vitro with radioactive
amino acids."
Biochem.J. 91, 59 (1964).
118. Tsao, M.U.,
"Heterogeneity of tissue dehydrogenase."
Arch.Biochem.Biophys. 90, 234 (1960).
119. Webb, E.C.,
"Nomenclature of multiple enzyme forms."
Nature 203, 821 (1964).
120. Wieland, Th., G. Pfeleiderer und F. Ortanderl,
"Über die Verschiedenheit der Milchsäuredehydro-
genasen.III.Vergleich der Milchsäuredehydrogenasen
aus verschiedenen Rattenorganen."
Biochem.Z. 331, 103 (1959).
121. Wieland, Th., G. Pfeleiderer, I. Haupt und W. Wörner,
"Über die Verschiedenheit der Milchsäuredehydro-
genasen.IV.Quantitative Ermittlung einiger Enzym-
verteilungsmuster.
Vergleichende Betrachtung bei verschiedenen Wirbel-
tierklassen."
Biochem.Z. 332, 1 (1959).
122. Wieland, Th. und G. Pfeleiderer,
"Multiple Formen von Enzymen."
Advanc.Enzymol. 25, 329 (1963).
123. Wieme, R.J.,
"Studies on agar gel electrophoresis. Techniques,
Applications."
These d'Agregation, Univ.Ghent (1959).
Arsica Uitgaven N.V., Brussel, 1959.
12. Wood, T.,
"Adenosine triphosphate-creatine phosphotransferase
from ox brain: Purification and isolation."
Biochem.J. 87, 453 (1963).
125. Wood, T.,
"Adenosine triphosphate-creatine phosphotransferase
from ox brain: Properties and function."
Biochem.J. 89, 210 (1963).

126. Wood, T. und P.D. Swanson,
"The occurrence of ATP-creatine phosphotrans-
ferase in particulate fractions from cerebral
tissue and its coupling to the sodium stimu-
lated microsomal ATPase."
J.Neurochem. 11, 301 (1964).
127. Yagi, K. und R. Mase,
"Coupled reaction of creatine kinase and myosin A
-ATPase."
J.Biol.Chem. 237, 397 (1962).

Meinen verehrten Lehrern, Herrn Prof. Dr. rer. nat.
Dr. med. h. c. Theodor Bücher und Herrn Doz. Dr. rer. nat.
Martin Klingenberg danke ich aufrichtig für die
Anregung und für grosszügige Unterstützung bei
meinen Arbeiten zu der vorgelegten Untersuchung.

Den Kollegen von der Abteilung
"Zellphysiologie" - meinen Freunden - danke ich
für ihre stete Hilfsbereitschaft.

Lebenslauf

Am 3. Juni 1934 wurde ich als Sohn des Amtsgerichtsrats Dr. Friedrich Jacobs und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Sass in Rostock geboren. Seit Sommer 1940 besuchte ich dort die Volksschule. Im Herbst 1944 trat ich in das humanist. Gymnasium Grosse Stadtschule zu Rostock ein. Am 19. März 1954 legte ich am Staatl. Gymnasium in Bochum die Reifeprüfung ab. Nach dem Abitur arbeitete ich ein halbes Jahr als Bauarbeiter. Im Wintersemester 1954/55 begann ich das Medizinstudium in Tübingen; dort studierte ich 2 Semester. Im Winter 1955/56 arbeitete ich im Rahmen des Werksemesters des Evang. Studienwerks Villigst 6 Monate als Walzwerksarbeiter. Im Sommersem. 1956 setzte ich das Studium an der Universität Marburg fort. In Marburg machte ich am 31. Oktober 1957 Physikum. Es folgten 4 Semester an der Universität Freiburg i. Br. Zum Winter 1959/60 ging ich für 2 Semester an die Universität Zürich. Von dort kehrte ich zum Wintersemester 1960/61 nach Freiburg zurück, wo ich am 8. Juni 1961 das Medizinische Staatsexamen ablegte.

Vom 1.10.1961 - 1.4.1965 arbeitete ich wissenschaftlich an der Abtlg. Zellphysiologie des Physiologisch - Chemischen Instituts der Universität Marburg. Seit dem 1.4.65 bin ich Medizinalassistent an der Mediz. Universitätsklinik Marburg.

Meine akademischen Lehrer waren folgende Professoren und Dozenten:

In Tübingen: Bünning; Möhres; Kossel; Wittig; Ehrhard, Feneis Jacobj, Möricke.

In Marburg: Dimroth, Mahr; Niessing, Petry, Rollhäuser, Wendt; Hensel; Bücher, H. Schmitz.

In Freiburg: F. Büchner, Rübsaamen; Weyrich; Haas, Hummel, Füsslin, Mager, O. Westphal; Janssen, Heidenreich; Heilmeyer, Bege- mann, Keiderling, Klepzig, Reindell, Weissbecker, Wetzlar. Sarre, Sartorius; Krauss, Kümmerle, Stutz; Bätzner; Wimhöfer, Dietz, Huber, Stegmann; Ruffin, Derwort, Faust; Keller, Beckmann, Betke, Krainick, Vivell; Wegner, Doden; Zöllner, Beickert; Kalkoff, Illig, Macher, Pfister; Rehm, Eschler; Schumacher.

In Zürich: Uehlinger, Hedinger, Zollinger; W. Löffler,
Rossier, Koller, Labhardt, Moeschlin; Hegglin; Böni;
A. Brunner; Cocchi; Francillon; Krayenbühl; Lüthy; Bleuler;
Held; Fanconi, Grob, Lutz, Hitzig, Prader, Willi; Rüedi, Stein-
mann; Burckhardt.

Marburg, den 1.4.1965

